

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939

N° 30. Série 2

SUBSTANCES HORMONALES
DANS
L'ŒUF ET L'EMBRYON
DES OISEAUX

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(Pharmacie)

présentée et soutenue le

PAR

Joseph RIBOULLEAU

Docteur en Pharmacie

de l'Université de Paris

Pharmacien diplômé de la Faculté de Paris

JURY { MM. GORIS, Président.
LAUNOY, Professeur.
JANOT, Maître de Conférences.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1939

SUBSTANCES HORMONALES
DANS L'ŒUF ET L'EMBRYON DES OISEAUX

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939

N° 30 série V

SUBSTANCES HORMONALES
DANS
L'ŒUF ET L'EMBRYON
DES OISEAUX

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(Pharmacie)

présentée et soutenue le

PAR

Joseph RIBOULLEAU

Docteur en Pharmacie

de l'Université de Paris

Pharmacien diplômé de la Faculté de Paris

JURY { MM. GORIS, Président.
LAUNOY, Professeur.
JANOT, Maître de Conférences.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1939

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS



ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, Doyen, O. ✱, § I.
 P. LEBEAU, Assesseur, O. ✱, § I. Membre de l'Institut
 H. J. LIONNET, Secrétaire, § I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. ✱, § I.	Membre de l'Institut.	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, § I.		Pharmacie galénique.
DAMIENS, O. ✱, § I.		Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, § I.		Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, § I.		Chimie organique.
LUTZ, ✱, § I.		Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, § I.		Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, § I.		Zoologie.
DELABY, ✱, § I.		Chimie analytique.
PICON, ✱, § I.		Physique.
MASCRE, § I.		Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, § I.		Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, § I. — GUERIN, O. ✱, § I.

Professeurs honoraires :

MM. BEHAL, G. O. ✱, § I. et DELEPINE, O. ✱, § I., Membres de l'Institut,
 GUERBET, ✱, § I., PERROT, C. ✱, § I., COUTIERE, O. ✱, § I.,
 BOUGAULT, O. ✱, § I. et TASSILLY, O. ✱, § I.

MAITRES DE CONFERENCES

FLEURY, § I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, § I.	Minéralogie, Législation et Dénatologie pharmaceutiques.
REGNIER, § I.	Parasitologie.
CHARONNAT, § I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.
VALLETTE, § I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1 ^{re} année....	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, § I., trav. prat. de 2 ^e et 3 ^e années.	Chimie analytique.
PARIS	Micrographie.
CORRIEZ	Physique.
GUILLOT, travaux pratiques de 4 ^e année	Chimie biologique, Bromatologie, et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, § A.

A MES PARENTS

Faible témoignage de ma profonde et
inaltérable affection.

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GORIS
Officier de la Légion d'Honneur
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux
et Hospices civils de la Seine

Témoignage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. CARIDROIT
*Directeur de la Station Physiologique
du Collège de France*

Hommage de respectueuse reconnais-
sance.

SUBSTANCES HORMONALES

DANS L'ŒUF ET L'EMBRYON DES OISEAUX

INTRODUCTION

C'est dans l'œuf qu'il faut rechercher le point de départ de toute existence, de toute vie animale. Frappé de ce que, seul, sans apport extérieur semblait-il, l'œuf pouvait créer de toutes pièces un organisme vivant, le monde ancien n'en avait-il pas été conduit à lui assigner l'origine du monde et à trouver dans ses constituants tous les éléments indispensables à la vie? De tout temps, l'œuf occupa une place importante aussi bien dans la religion hindoue que dans les croyances des Egyptiens et des Phéniciens. Cybèle, la mère de tous les dieux grecs, était née d'un œuf.

Source initiale de toute vie, l'œuf est capable de reproduire l'espèce correspondante, l'un ou l'autre sexe indifféremment, semble-t-il. Si nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de distinguer avant l'incubation le sexe de l'animal en puissance dans un œuf, des travaux récents ont permis cependant d'inverser expérimentalement le sexe chez l'embryon.

Les résultats obtenus à ce sujet par Vera DANTCHAKOFF (1935) d'une part, par WOLF et GINGLINGER (1935) ainsi que par KOZELKA et GALLACHER (1934) d'autre part, ont montré combien il était relativement facile d'obtenir une inversion du sexe dans un embryon de poulet à déterminisme mâle. Un dépôt adéquat de solution huileuse d'hormone femelle introduit dans le sac allantoïdien au 4^e-5^e jour d'incubation, suffit pour cela; car, grâce à la relativité du déterminisme génétique, chacune des deux gammes de réaction sexuelles

peut, au début, être dirigée dans le sens contraire à son déterminisme.

Une inversion sexuelle des ébauches gonadiques femelles du Poulet par introduction d'hormone mâle, fut au début assez difficile. Les auteurs se demandèrent alors si cette inefficacité de l'hormone mâle pouvait dépendre de ce que, dans une ébauche gonadique, qu'elle soit génétiquement mâle ou femelle, la cellule germinale est déposée chez l'embryon du Poulet dans la lame splanchnique au contact immédiat avec l'épithélium cœlomique. Ultérieurement, cette disposition est l'attribut du sexe femelle. D'où la nécessité de rompre préalablement ces corrélations, en employant par exemple l'irradiation précoce des embryons femelles.

Voici d'ailleurs les conclusions auxquelles aboutit Vera DANTCHAKOFF, résumant ainsi le résultat de ses recherches : « Une inversion sexuelle peut être obtenue dans des embryons de Poulet, génétiquement normaux, à la suite d'une substitution des corrélations tissulaires germino-somatiques. Dans l'inversion du sexe mâle, une stabilisation des corrélations tissulaires primaires, à tendance femelle dans les deux sexes, et l'établissement d'un cortex ovarique sont obtenus par l'action du « Progynon » et par cela même un facteur inhibant les corrélations mâles est introduit dans l'organisme de l'embryon génétiquement mâle. Dans l'inversion du sexe femelle, une soustraction de l'inhibition corticale est obtenue dans l'embryon femelle, à la suite de l'atrophie graduelle du cortex dans un embryon soumis aux rayons X. De ce fait, une éclosion de corrélation germino-somatique mâle peut avoir lieu dans un organisme à déterminisme génétique femelle. »

Et Vera DANTCHAKOFF en arrive à supposer l'existence d'hormones de cause génétique.

Mais alors, *dans un œuf normal, n'y a-t-il pas de différences hormonales suivant le sexe? Que deviennent ces substances au cours de l'incubation?*

C'est à ces questions qui en découlent naturellement, que nous avons essayé de répondre au cours de ce travail.

Nous avons cru bon de rappeler tout d'abord, en un bref exposé, la composition chimique de l'œuf de poule. Nous nous sommes ensuite employé à mettre au point une technique d'extraction des substances hormonales de l'œuf. En possession d'un moyen pratique d'investigation, nous avons alors étudié la teneur et les variations des substances hormonales dans l'œuf normal, puis aux divers stades de l'incubation.

L'exposé de nos recherches se fera d'ailleurs dans l'ordre suivant:

PREMIERE PARTIE:

Chapitre I. — L'ŒUF DE POULE.

Chapitre II. — MÉTHODES D'EXTRACTION DES SUBSTANCES HORMONALES.

Chapitre III. — MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DOSAGE.

- a) Test du vagin de la Rate castrée.
- b) Test de l'utérus de la Rate castrée.
- c) Test du plumage du Chapon.
- d) Test de la crête du Chapon.
- e) Test des vésicules séminales du Rat castré.

Chapitre IV. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX OBTENUS AVEC L'ŒUF.

Chapitre V. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

DEUXIEME PARTIE.

Chapitre I. — LES SUBSTANCES ŒSTROGÈNES DE L'ŒUF DE POULE AU COURS DE L'INCUBATION ET DANS L'EMBRYON.

Chapitre II. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

CONCLUSIONS GENERALES.

*
**

Avant de développer ces divers chapitres et d'exposer les résultats obtenus dans ce travail, qu'il me soit permis de remercier vivement M. le Professeur A. GORIS qui a bien voulu m'accepter dans son laboratoire et de l'assurer de toute ma respectueuse gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à M. F. CARIDRON, Directeur de la Station Physiologique du Collège de France, qui m'a conseillé dans le choix du sujet de ce travail.

Je remercie sincèrement M. le Professeur LAUNOY d'avoir bien voulu me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse.

Je prie M. M.-M. JANOT, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie, auprès duquel j'ai toujours trouvé l'accueil le plus bienveillant, d'accepter ici le témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

Il m'est agréable d'exprimer ma gratitude à M. le Docteur P. GLEY et aux Laboratoires ROUSSEL, pour l'obligeance avec laquelle ils mirent les ressources de leur laboratoire à ma disposition et pour l'accueil cordial que j'y ai toujours trouvé.

Enfin, je n'oublierai jamais l'atmosphère de sympathie que j'ai sans cesse rencontrée auprès du personnel et des élèves de la Station Physiologique du Collège de France; qu'ils veuillent bien croire tous ici à ma vive reconnaissance.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

L'ŒUF DE POULE

Rappelons brièvement, avant d'aborder ce sujet, quelques notions générales sur l'œuf de poule, sa formation et sa composition.

FORMATION DE L'ŒUF

Le segment mobile de l'oviducte s'évagine au moment de l'accouplement et sort béant du cloaque. C'est sur ce segment que le coq dépose le liquide séminal en y appliquant le tubercule qui remplit, chez les Gallinacés, les fonctions de pénis. Le segment, en reprenant sa position initiale, frotte sur les parois du cloaque qui se trouve presque toujours infecté de microorganismes divers. Il en est d'ailleurs de même pour le tubercule du Coq. Les microbes dont se charge inévitablement le liquide séminal, se fixent sur les parois de l'oviducte ou sont entraînés par les spermatozoïdes pour infecter les organes génitaux supérieurs de la poule.

Le follicule, ayant la forme d'un globe jaunâtre constituant le jaune et formé de l'ovule et de son vitellus, tombe, après rupture de la membrane ovarique, dans l'oviducte, conduit vecteur ayant chez la poule une longueur voisine de 50 cm. On peut distinguer dans cet organe plusieurs régions nette-

ment différenciées, jouant chacune un rôle spécial dans la formation de l'œuf. Après un parcours de 6 à 8 cm. dans la partie supérieure de l'oviducte, où la fécondation s'opère probablement, le jaune descend ensuite dans une partie plus longue, 25 cm. environ, tapissée de nombreuses glandes albuminipares. En même temps qu'il s'enrobe d'albumine par couches concentriques, il subit un mouvement de rotation en spirale lui imprimant une translation qui amène sa descente dans la troisième partie de l'oviducte. Son mouvement spiralé tord les couches d'albumine en avant et en arrière du jaune pour former les cordons appelés chalazes. L'œuf se trouve inclus en quelques heures, à son arrivée dans la dernière partie de l'oviducte, dans une membrane à deux feuillets appelée membrane coquillière ou testacée. Il passe ensuite dans la chambre coquillière où se forme son enveloppe calcaire et où il séjourne environ 24 heures.

D'après A. ORRU (1936), l'œuf met au moins 9 jours à évoluer et 11 pour être pondue.

Se trouvant ainsi définitivement constitué, l'œuf traverse la partie vaginale de l'oviducte et tombe dans le cloaque d'où il est expulsé par l'action contractive de cet organe.

CONSTITUTION DE L'ŒUF

L'œuf de poule étant le plus couramment utilisé, nous nous occuperons tout spécialement de lui. Son poids moyen varie de 50 à 60 gr., il est fonction de l'âge, de la nourriture et de la race de la pondeuse (R. LIENHART, 1923). Et, si l'on réfléchit, comme le fait remarquer si justement L. BINET (1934) que, dans les centres d'élevage, on est parvenu, grâce à la sélection, à l'alimentation et à un éclairage prolongé, à obtenir par poule plus de 300 œufs par an, ce qui correspond à près de 20 kgs dans une année pour un organisme de 2 kgs, on est émerveillé par le pouvoir de synthèse de l'appareil génital de la poule tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif. De forme irrégulière, l'œuf de poule mesure en

moyenne de 55 à 65 mm. pour le grand diamètre, 35 à 45 mm. pour le petit.

La coquille a une épaisseur de 2 à 3/10^e de mm. constituée en grande partie par du carbonate de calcium (92 % environ) (HEIM DE BALSAC, 1931) avec un peu de carbonate de magnésium, de phosphates et de matières organiques (N. ROMANKEVITCH, 1932). Elle représente une véritable réserve calcique pour l'embryon au cours de son développement et intervient lors de l'incubation dans l'édification du squelette du poussin (C. DELEZENNE et E. FOURNEAU, 1918). Elle possède de plus une porphyrine qui confère à l'œuf examiné sous la radiation de Wood, une belle coloration rouge (A. TAPERNOUX, 1930). Le pigment s'altère d'ailleurs rapidement au contact de la lumière du jour, comme l'ont prouvé, après celles de E. DERRIEN (1924) et J. TURCHINI (1924), de nombreuses autres recherches (A. TAPERNOUX, 1930; H. BIERRY et B. GOUZON, 1932; Ch. DHÉRÉ, 1933). De plus, elle est percée par une multitude de petits pores plus ou moins apparents, la rendant perméable aux gaz. liquides et microbes (GAYON, 1873 ; ARTAULT, 1893; LUCAM, 1930; OSBORNE, 1931). La teinte est variable, blanche ou colorée suivant la race de la poule, la coquille colorée étant plus résistante. Cette résistance varie également, selon les déterminations de P. COTET (1932), avec les diverses parties de la coquille; le petit bout de l'œuf est plus résistant au choc que le grand et c'est le milieu qui résiste le plus.

Tapissant l'intérieur de la coquille, se trouve la membrane testacée (J.-G. SZUMAN, 1925; E. FURREG, 1931) constituée par de la kératine (MARSHALL, 1922) et de résistance plus grande et moins perméable que la coquille (ROMER, 1923-1924). Elle est formée de deux feuillets se décollant vers l'extrémité la plus arrondie de l'œuf pour former la chambre à air (N. MIHAILESCU, 1933). Celle-ci augmente au cours du vieillissement de l'œuf par suite de l'écartement des deux feuillets, provoqué par le brusque retrait du contenu de l'œuf par suite de l'évaporation qui se produit à l'intérieur, évaporation plus ou moins rapide, suivant l'atmosphère, la température et l'âge de l'œuf (F. LATASTE, 1925); elle se produit au gros bout de

l'œuf parce que la membrane coquillière, que le blanc tend à ramener avec lui, s'accroche aux irrégularités de la coquille, plus fréquentes, plus grandes au petit qu'au gros bout et parce qu'à ce dernier elle est plus facilement clivable. On peut d'ailleurs déceler aisément au mirage cette augmentation qui permet ainsi de connaître approximativement l'âge d'un œuf (VITOUX et FLANDEAU, 1925). BUFFON déjà l'avait remarqué lorsqu'il écrit : « Dès que l'œuf est pondu, il commence à transpirer et perd quelques grains de son poids chaque jour par l'évaporation des parties les plus volatiles de ses sucs. » Le poids de la coquille et de la membrane représente 8 à 10 % du poids total de l'œuf.

Constitution chimique du blanc.

C'est une solution albumineuse, visqueuse, de réaction alcaline (RUBINSTEIN, 1932). D = 1, 042. Il représente 50 à 60 % du poids total et pèse en moyenne 30 gr.

L'albumine est constituée principalement par 85 % d'eau, 13 à 15 % de matières albuminoïdes représentées par de l'ovalbumine cristallisable dans la structure de laquelle entrent deux acides aminés : la lysine, indispensable à la croissance, et le tryptophane assurant la conservation du poids (expériences d'OSBORNNE et MENDELL); l'ovalbumine crue de l'œuf résiste nettement aux sucs digestifs; elle a une action empêchante sur la digestion trypsique de l'ovalbumine coagulée (C. DELEZENNE et E. POZERSKI, 1903-1905).

Il contient également 1 % d'ovalbumine et un gluco-protéide, l'ovomucoïde. De plus, il existe dans le blanc d'œuf un principe lytique, la lysozyme, s'opposant au développement des germes (WURTZ, 1890) qui peuvent être inclus dans le blanc et conserve à celui-ci pendant un certain temps, une stérilité appréciable (FLEMING et ALLISON, 1922-1924; BORDET, 1928; ANDERSEN, 1931; BINET et JERAMEC, 1933; ROCHAIX et COUTURE, 1934); cette substance n'existe que dans le blanc et résiste aux ferments digestifs.

Mais, au cours du vieillissement de l'œuf, il se produit bientôt des modifications importantes au point de vue chimique. L'albumine perd très rapidement son pouvoir de cristallisation, signe de la transformation intime de la matière. BIDAULT signale que, pour un œuf naturel, l'albumine cristallise du premier au onzième jour, puis du onzième au vingtième jour assez irrégulièrement, et ensuite ne peut plus cristalliser.

D'autre part, on décèle une augmentation assez importante et progressive de N ammoniacal; une élévation de la teneur en sucre; le pH croît aussi avec l'âge: de 7,7 pour du blanc frais, il atteint 9,4 au huitième jour.

Au point de vue bactériologique, il convient de rappeler la disparition du pouvoir lytique du blanc d'œuf et le développement de flore bactérienne (GAYON, 1873; MASSERON, 1930 ; THIEULIN, 1933; A. ROCHAIX, 1934).

Constitution chimique du jaune.

Le jaune représente 28 à 30 % du poids de l'œuf, soit 40 % du contenu de celui-ci, et pèse de 15 à 18 gr. Il est enveloppé par une membrane vitelline très fragile, formée d'un réseau de fines fibrilles; sa réaction est acide alors que, pour le blanc, elle est alcaline. Il est suspendu dans l'œuf par des cordons appelés chalazes. La rupture de ceux-ci et la liquéfaction de l'albumine dans un œuf âgé provoque l'ascension du jaune. Si l'œuf est debout, le jaune vient au contact de la chambre à air et n'est jamais adhérent. S'il est maintenu à plat, le jaune vient au contact de la membrane coquillière et y adhère parfois assez fortement.

La cellule vivante de l'œuf contenant la vésicule germinative est visible en un point de sa surface sous forme d'une tache circulaire de 2 à 3 mm., appelée *disque prolifère* ou *cicatricule*.

Les anomalies de teinte du jaune sont liées en général à une alimentation plus ou moins riche en aliments chlorophylliens ou à la race de la Poule.

Au point de vue de la composition chimique, le jaune d'œuf comprend notamment :

— 50 à 51 % d'eau, beaucoup moins que le blanc.

— 29 à 30 % de matières grasses se répartissant en 21 % de graisses émulsionnées et 8 % de graisses phosphorées ou lécithines (DASTRE, 1876; HAHN et HEVESY, 1937) contenant, d'après les analyses d'Octave BAILLY (1916), deux acides glycérophosphoriques isomères α et β , l'isomère β γ étant quatre fois plus abondant que l' α , ce qui mérite d'être souligné, étant donné la puissance thérapeutique du glycérophosphate β dans l'asthénie, le surmenage intellectuel et les troubles nerveux à forme dépressive. Il existe aussi à côté de la lécithine, deux autres phosphatides : la céphéline et la sphingomyéline : 15 % d'une matière albuminoïde, appelée ovovitelline, qui est une phosphoprotéine voisine de la caséine, donnant par dislocation de sa molécule, une substance phosphorée et ferrugineuse appelée l'hématogène de G. BUNGE (1885) qu'il faut considérer comme une hémoglobine embryonnaire (L. HUGOUNENQ et A. MOREL, 1905-1906); la teneur du jaune en fer correspond à 0 gr. 14 % (ELVEHJEM, KEMMERER et HART, 1929), ce qui permet au poussin de fabriquer son hémoglobine au cours de l'incubation. A côté de l'ovovitelline, citons une deuxième matière albuminoïde, dite livetine (H.-D. KAY et P.-G. MARSCHALL, 1928).

La quantité de cholestérol dans l'œuf est assez différente suivant les auteurs. A. GRIGAUT (1913) a trouvé dans le jaune 2 %, L. BINET et M. LAUDAT 1,40 % tandis que E. GARJOUX et A. KRÍJANOWSKY (1932) ont obtenu une teneur intermédiaire de 1,78 %.

La richesse en cholestérol du jaune d'œuf de cane est, remarquons-le en passant, deux fois celle du jaune d'œuf de poule.

— peu de sucre, soit qu'on envisage le sucre libre ou le sucre combiné aux matières albuminoïdes.

— un peu de chlore (0,15 à 0,16 %) et de l'N à l'état ammoniacal (0,003 %).

— 1 % de cendres contenant en particulier de l'acide phosphorique et du fer organique.

En plus de ces principes chimiques fondamentaux, l'œuf contient des éléments physiologiques importants, connus seulement pour la plupart que depuis peu d'années: ferments, diastases, vitamines.

On a signalé dans le jaune d'œuf l'existence de quatre vitamines:

— Vitamine A ou de croissance, provenant en grande partie de l'alimentation (CRUISKSHAND and MOORE, 1937) et s'y trouvant sous deux formes: la vitamine A proprement dite, incolore et des carotinoïdes représentés par un mélange de xanthophylle et de zéaxanthine, semblant donner naissance à la vitamine A.

— Vitamines B¹, B², B³ qui sont non seulement des vitamines antinévritiques, mais encore des vitamines d'utilisation nutritive.

— Vitamine D antirachitique, dont la quantité augmente sous l'influence de l'irradiation ultra-violette des pondeuses (HUGUES, TITUS et MOORE, 1925; MAUGHAN G.-H. et T., 1933).

— Il contient encore un peu de vitamine E ou de reproduction.

Il convient de souligner d'autre part l'absence complète de vitamine C antiscorbutique, et la présence d'une substance insulinoïde identique à l'insuline, faisant baisser le taux de sucre au même titre que celle-ci (Y. SCHIKINAMI, 1928).

On doit signaler les variations très importantes de ces facteurs suivant l'alimentation (TERROINE et BELIN, 1927) et l'irradiation des poules. La vie au grand air et la quantité plus ou moins grande d'aliments verts peuvent quintupler la richesse du jaune en facteur A (BETHKE, KENNARD et SASAMAN, 1927).

Les vitamines A et D se retrouvent dans les œufs cuits, conservés et même dans les poudres d'œuf du commerce. La vitamine B, plus fragile, est détruite par la cuisson ou la conservation.

On sait que l'œuf contient aussi divers ferments (WOHLGEMUTH, 1905), l'amylase et l'invertine, capables d'attaquer l'amidon et le sucre de canne. Il est, de plus, doué d'un pouvoir renforçateur des ferments (A. HERLITZA, 1907), c'est le pouvoir zymosthénique décrit par H. ROGER (1910) et qui le rend capable, par sa seule présence, d'élever le pouvoir d'attaque de certains ferments digestifs. Enfin l'œuf contient des substances œstrogènes dont nous reparlerons plus loin.

Tous ces éléments ont contribué à donner à l'œuf une place importante dans l'économie d'un pays. L'industrie photographique et la teinturerie utilisent actuellement l'albumine, mais c'est surtout dans l'alimentation, ainsi que dans l'industrie alimentaire, la pâtisserie, la biscuiterie, les nougats que les œufs sont employés. Au point de vue médical et pharmaceutique, l'œuf tenait une place importante : le blanc était utilisé à la clarification de toutes les liqueurs et comme contre-poison des sels minéraux, le jaune comme agent d'émulsion des résines, gommés-résines et huiles volatiles et comme milieu de culture en bactériologie.

Sa richesse en phosphore, en fer, en vitamines, en ferments, permet aussi de considérer l'œuf comme un médicament efficace et précieux. Sa richesse en albumine et en graisse lui confère un pouvoir énergétique remarquable, toutes ces qualités s'appliquant évidemment surtout à l'œuf frais. Claude BERNARD n'enseignait-il pas que l'œuf était un aliment vivant, mais un aliment fragile, dont le vieillissement est particulièrement rapide. A ce sujet, les Anciens, dont la vénération pour l'œuf est connue de tous, considéraient l'œuf du jour comme l'œuf d'or, l'œuf de la veille comme l'œuf d'argent, l'œuf de trois jours comme l'œuf de fer. Cette date passée, ils admettaient que les œufs n'étaient plus propres à la consommation. Que diraient-ils, de nos jours, en constatant tous les procédés employés actuellement pour la conservation des œufs et en voyant couramment utilisés ces poudres d'œuf, de cet œuf dont Orphée avait fait le symbole de la fécondité, puisque tout y pousse, tout y végète, tout y renaît?

CHAPITRE II

METHODES D'EXTRACTION DES SUBSTANCES HORMONALES

Nous venons de voir, à propos de la composition chimique du vitellus, que quelques auteurs (FELLNER, 1925 ; MORELL, 1930 ; GLIMM et WADEHN, 1930) ont signalé la présence dans l'œuf de Poule de substances capables de déclancher l'œstrus chez la Souris ou la Rate castrée. Ils ne parlent toutefois pas de la teneur en substances œstrogènes avec précision et nous n'y trouvons aucune indication sur leur origine, leur nature et leurs variations. Avant de vouloir reprendre ces diverses questions, il nous paraît indispensable d'exposer avec soin les méthodes d'extraction que nous avons constamment utilisées au cours de nos recherches.

Pour extraire les substances hormonales de l'œuf, nous n'opérons que sur le vitellus ; le blanc ne contient pas de stériles et n'offre donc, en ce qui concerne notre sujet, qu'un intérêt restreint. Les opérations préliminaires seront, avant l'extraction : 1° Pesée de l'œuf ; 2° Séparation du jaune et du blanc ; 3° Pesée du jaune.

EXTRACTION

Principe.

C'est en nous basant, d'une part, sur la composition chimique du jaune d'œuf et, d'autre part, sur les propriétés des substances œstrogènes que nous avons établi notre techni-

que. Nous ferons spécialement appel aux propriétés générales suivantes des substances hormonales :

a) Les substances œstrogènes passent dans le chloroforme, en milieu acide ;

b) En saponifiant le résidu chloroformique obtenu, on élimine toutes les graisses neutres du jaune d'œuf entraînées par le chloroforme ;

c) La solution hormonale, se trouvant dans la solution aqueuse sodée, ne passe en solution étherée qu'en milieu acide.

De cette façon, en reprenant par l'huile d'olive neutralisée, on obtient une solution huileuse limpide, propre au dosage biologique.

Technique.

A. — Extraction avec hydrolyse.

Les jaunes isolés sont traités par le chloroforme, additionné d'une quantité convenable d'acide. Pour une douzaine de jaunes, l'emploi de deux litres de chloroforme est nettement suffisant. Il faut de plus acidifier convenablement le milieu en ajoutant au chloroforme 1/10^e de son volume en acide chlorhydrique. On fait une *hydrolyse* de 8 heures au bain-marie avec réfrigérant ascendant pour dissocier les substances hormonales si elles se trouvaient à l'état de combinaison totale ou partielle. La solution chloroformique est alors recueillie par décantation, puis filtrée. Le chloroforme est récupéré par distillation et la solution d'une couleur jaune citron ou orangé devient alors de couleur brun foncé, et de consistance huileuse.

Le résidu chloroformique ainsi obtenu contient non seulement les substances œstrogènes, mais encore les matières grasses contenues dans le jaune d'œuf : d'où la nécessité de saponifier le mélange. Cette saponification, pour être complète, doit être d'une durée voisine de deux heures avec une solution de soude convenablement concentrée (20 % en poids)

et en excès (100 cc. de cette solution par demi-douzaine d'œufs). A ce moment, la mousse, qui était apparue au début de la saponification, a complètement disparu.

On sépare alors, après refroidissement, la solution sodique du savon solide qui s'est formé à sa surface. On acidifie cette solution par addition d'acide chlorhydrique pur, ajouté peu à peu jusqu'au virage au rouge du papier de tournesol. On laisse refroidir avant d'ajouter l'éther. La substance hormonale étant en solution aqueuse passe, maintenant que celle-ci est acidifiée, dans l'éther. La solution éthérée se trouve à la partie supérieure, on la recueille par décantation, puis on recommence une deuxième et troisième extraction, afin d'être certain que toutes les substances hormonales se trouvent dans l'éther. Les solutions éthérées sont réunies ; l'éther s'évaporant rapidement à l'air, on lui ajoute une quantité exactement mesurée d'huile d'olive neutralisée. La substance hormonale passe de l'éther dans l'huile sans aucune perte et l'on obtient ainsi une solution propre au dosage physiologique des substances isolées.

Insistons, avant de terminer, sur les deux faits suivants que nous avons observés au cours de nos diverses extractions.

1° La nécessité d'acidifier convenablement la solution chloroformique, car l'extraction en milieu neutre et, à fortiori, en milieu alcalin, ne donne aucun résultat, les substances hormonales ne passant pas en milieu chloroformique neutre ou se trouvant modifiées par l'alcali.

2° L'emploi d'une solution de soude à 20 % en poids pour la saponification du résidu chloroformique, tout en présentant l'avantage d'opérer ensuite avec un volume assez restreint, ne possède pas l'inconvénient des solutions sodiques plus concentrées qui, comme nous en avons fait la constatation, doivent dissocier la molécule de la substance œstrogène ; celle-ci en effet ne se retrouve plus alors au cours de l'extraction.

B. — Extraction sans hydrolyse.

L'hydrolyse de huit heures, indiquée au début de notre technique précédente, peut être supprimée dans le cas du vitellus d'œuf normal, car, au cours de nos diverses expériences, nous avons toujours obtenu les mêmes résultats en employant parallèlement ces deux méthodes. Par contre, dans nos recherches sur l'œuf au cours d'incubation, nous n'avons employé que la première technique afin d'obtenir une dissociation certaine et complète des embryons.

CHAPITRE III

METHODES BIOLOGIQUES DES DOSAGES HORMONAUX

Les substances hormonales ainsi isolées du vitellus de l'œuf, ont été éprouvées avec plusieurs tests, dans le but d'obtenir des renseignements sur leurs propriétés physiologiques et d'apprécier leur quantité par comparaison avec les hormones chimiquement connues. Nous avons successivement employé :

- 1° Le test vaginal de la Rate castrée,
- 2° Le test de l'utérus de la Rate castrée,
- 3° Le test du plumage du Chapon,
- 4° Le test de la crête du Chapon,
- 5° Le test des vésicules séminales de Rat impubère.

TEST VAGINAL DE LA RATE CASTREE (TEST D'ALLEN ET DOISY)

Toutes les hormones dites folliculiniques ont, à des degrés divers, une propriété physiologique semblable qui permet, sans leur être absolument spécifique, de les reconnaître et de les doser : elles provoquent le rut chez les Rates castrées. Le rut se traduit par un phénomène particulier facilement appréciable : les cellules de l'épithélium vaginal se kératinisent.

Cette kératinisation n'apparaît que vers le 2° ou 3° jour suivant l'injection, selon la concentration de la solution employée et la sensibilité individuelle des Rates utilisées. Aussi convient-

il, dès le deuxième jour, de faire des frottis vaginaux et ce, au moins deux fois par jour avec une sonde stérile. Le frottis rendu bien homogène par étalement sur une lame de verre, est fixé par l'alcool fort. La coloration peut se faire à l'aide de nombreux colorants. Nous indiquerons, à titre documentaire, deux méthodes que nous avons utilisées.

PREMIÈRE MÉTHODE. — Cette méthode, qui est à conseiller par suite de sa simplicité et de ses excellents résultats, est basée sur l'emploi d'une solution de thionine phéniquée dont voici le mode de préparation :

Les composés sont :

Thionine	0 gr. 50
Alcool absolu	10 cc.
Acide phénique	8 gr.

on les triture ensemble et on laisse dissoudre 24 heures dans un flacon bien bouché; puis on ajoute :

Eau distillée	90 cc.
-------------------------	--------

On agite, on filtre ; le colorant peut être alors employé ; mais nous conseillons d'attendre au moins trois semaines avant de l'utiliser, car la coloration est à cette date pratiquement inaltérable. Pour colorer le frottis préalablement fixé, il suffit de le recouvrir de quelques gouttes du colorant ; au bout de quelques minutes, on lave à l'eau, on laisse sécher et on examine au microscope.

DEUXIÈME MÉTHODE. — Ce procédé, quoique légèrement plus long, donne de très bons résultats. L'étalement homogène du frottis vaginal est fixé par l'alcool fort. On maintient le frottis 10 à 15 minutes dans une solution d'hémalun, on lave ensuite à l'eau alcaline puis on fait une deuxième coloration en plongeant la lame une minute environ dans une solution aqueuse d'éosine à 1 %. On lave à l'alcool, on sèche.

La solution d'hémalun utilisée est préparée de la façon suivante : 0 gr. 40 d'hématéine sont broyés dans un mortier avec quelques gouttes de glycérine. Après obtention d'une pâte bien homogène, on lave le mortier par portions avec le liquide suivant, de manière à entraîner toute la pâte :

Eau distillée	70 cc.
Glycérine	30 cc.
Alun de potasse	5 gr.

On fait dissoudre à chaud l'alun dans l'eau, puis on ajoute la glycérine ; on peut acidifier en ajoutant 2 % d'acide acétique cristallisable. Sous l'effet de cette coloration, les cellules kératinisées sont nettement visibles par suite de leur coloration rose et les noyaux des cellules épithéliales non kératinisées sont colorés en violet foncé.

L'aspect d'un frottis vaginal de rate castrée au repos se caractérise par la présence de petites cellules épithéliales nucléées et de nombreux leucocytes. Le frottis du pro-œstrus se différencie par : 1° Une augmentation de mucus ou « pseudo-mucus », comme dit KORENCHEWSKY (1935), à cause de l'absence de toutes les réactions caractéristiques du mucus ; — 2° Une apparition de cellules nucléées ; — 3° une disparition des leucocytes. Au fur et à mesure que l'œstrus se développe, le pseudo-mucus disparaît et le frottis caractéristique de l'œstrus consiste uniquement en grandes cellules kératinisées, sans noyau et éosinophiles.

En examinant au microscope un frottis vaginal, il est très facile de reconnaître les cellules chargées de kératine, sorte de matière cornée que l'on trouve également dans les cellules superficielles de la peau. L'œstrus fait défaut chez l'animal à qui on a enlevé les ovaires, mais l'injection d'une quantité suffisante d'hormones œstrogènes permet de le faire apparaître.

Le principe de ce dosage consiste à rechercher quelle est la plus petite quantité de l'extrait ou de la substance employée qui provoque la réaction œstrale, recherche qui se fait par approximations successives. Cette quantité renferme par définition l'unité d'activité ; c'est donc une réaction de seuil, de tout ou rien. Cependant, il ne faudrait pas croire que toutes les ratées castrées réagissent à une même dose ; la sensibilité, au contraire, est très variable suivant les sujets. Aussi convient-il, pour doser avec exactitude les substances hormonales,

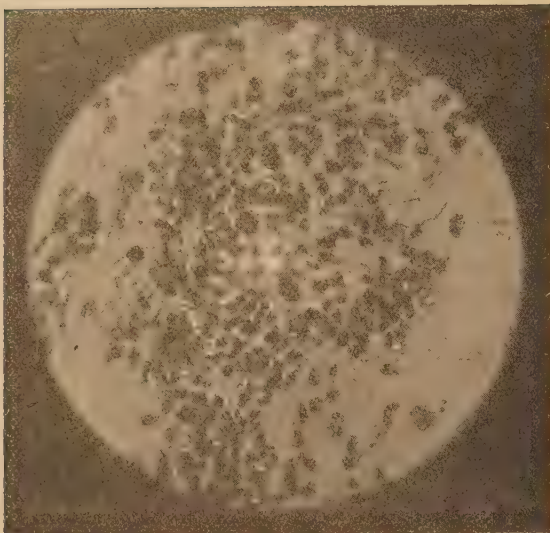


FIG. 1.
Frottis vaginal de Rate castrée.
(Petites cellules épithéliales nucléées,
leucocytes)
 (Microphoto — Gross. 400).



FIG. 2.
Frottis vaginal de Rate castrée ayant reçu
des injections d'œstrone. Œstrus. Grandes
cellules kératinisées anucléées.

(Microphoto — Gross. 400).

d'opérer avec soin et dans des conditions très rigoureuses de titrage ; c'est pourquoi il nous semble indispensable de préciser les conditions dans lesquelles nous avons opéré au cours de nos dosages.

Nous avons utilisé une série de Rates castrées dont nous avons éprouvé la sensibilité par des injections préalables de folliculine (œstrone) à doses déterminées et croissantes, échelonnées à partir de 2 γ suivant une progression arithmétique de raison 2. Lorsque ces Rates présentaient la réaction totale d'œstrus, elles étaient laissées au repos pendant 15 jours puis soumises à la dose intermédiaire entre celle qui avait provoqué l'œstrus et la précédente. La solution d'œstrone était injectée par voie sous-cutanée, à dose unique ; le véhicule employé était constitué par de l'huile d'olive neutralisée.

De cette façon, le dosage physiologique permet d'obtenir une précision de 10 % qui, sans atteindre celle des dosages chimiques, est cependant très suffisante au point de vue biologique, car l'erreur est ainsi très faible par rapport à celle due aux variations de la sensibilité individuelle.

Dans ces conditions, lorsqu'au cours de nos expériences, nous aurons déterminé la quantité minimum de la solution huileuse obtenue à partir des jaunes d'œuf, capable de provoquer le rut par injection à une de nos Rates préalablement étalonnées, nous dirons que la dose injectée correspondait, en pouvoir œtogène, à la quantité d'œstrone déclanchant le rut. Si la Rate était sensible par exemple à 4 γ , nous dirons que la quantité injectée de notre solution contenait l'équivalent de ces 4 γ en substances œstrogènes.

TEST DE L'UTERUS DE LA RATE CASTREE

L'utérus subit au cours du cycle sexuel des variations qui dépendent vraisemblablement de deux groupes hormonaux (celui de l'œstrone et celui de la progestérone).

Au pro-œstrus, toutes les parties constitutives de la paroi interne utérine prolifèrent : muqueuse et glandes, tunique mus-

culeuse. Un liquide de sécrétion commence à apparaître dans la lumière de l'organe. Les cellules épithéliales sont hautes et cylindriques. (LANGSTON et ROBINSON, 1935.)

La sécrétion augmente pendant l'œstrus et distend l'organe. La paroi s'amincit sous cet effet mécanique. Les cellules épithéliales sont plutôt cubiques.

Pendant le met-œstrus, la résorption commence et il y a apparition de nombreux leucocytes.

Au dioestrus ou phase de repos, la paroi paraît plus épaisse que pendant l'œstrus à cause de l'absence de pression externe. L'endomètre est compact et dans l'épithélium, de place en place, se voient des vacuoles remplies de leucocytes.

L'ovariectomie amène une atrophie de toutes les parties de la paroi utérine et une diminution de poids de l'organe.

En moyenne, l'utérus d'une Rate de 300 gr. pèse 365 mgr. pendant le dioestrus et 35 mgr chez une Rate ovariectomisée de 285 gr.

L'effet de l'œstrone sur la Rate castrée est de faire proliférer tous les tissus de la paroi aussi bien le tissu épithélial et glandulaire que les tissus musculaire et conjonctif. On obtient ainsi assez facilement l'aspect du pro-œstrus.

La distension caractéristique de l'œstrus ne s'observe pas souvent complètement comme chez la Rate normale. Avec 30 γ d'œstrone par jour qui est, d'après KORENCHEWSKY et DENNISON (1935-1936), la dose toxique pour la Rate, on n'obtient qu'un début de distension. Il semble donc que, déjà à ce stade, l'effet d'une hormone différente de l'espèce œstrogène doive se faire sentir. COURRIER et POTVIN (1928) supposent qu'il manque la présence de l'hormone lutéinique de l'ovaire. La réaction vaginale est obtenue, d'après EBHARDT (1926), à dose plus faible que la réaction utérine.

TEST DU PLUMAGE DU CHAPON

PEZARD et CARIDROIT (1922) ont montré que, par un moyen très simple, on pouvait apprécier l'état hormonal présent chez l'oiseau. Il suffit de déplumer partiellement une région du

corps. La plume en bourgeon qui repousse subit, pendant sa croissance, toutes les influences de l'ovaire ; et il en reste des traces dans la forme et la pigmentation de la plume. Il est possible de connaître la longueur du bourgeon chaque jour. Quand la plume a achevé sa croissance, rien n'est plus simple d'apprécier le temps s'écoulant entre l'opération et la manifestation d'activité ou « temps de latence », ainsi que le temps d'action du produit injecté, par simple mesure de la zone modifiée. La plume est donc aussi un excellent réactif pour juger de la *durée* d'action des substances utilisées.

Rappelons brièvement les caractères du plumage de la race Leghorn doré, dont nous nous sommes servi comme test, en nous contentant de comparer les régions de dimorphisme sexuel, c'est-à-dire le camail, la gorge, le dos (régions interscapulaire et lombaire), les couvertures des ailes et les rémiges secondaires. Les plumes du camail, effilées chez le mâle, avec l'axe noir et les barbes jaune orangé, sont arrondies chez la femelle avec marge jaune et partie centrale noire. Pour les plumes du dos, surtout dans la région lombaire, les différences de forme sont plus accentuées que pour le camail ; chez le Chapon, la Chaponne et le Coq, les plumes sont très effilées (lancettes) et leur coloration, rouge orangé avec base noire ; les plumes sont arrondies, tigrées, jaune et noir chez la Poule. Les plumes neutres qui sont celles du Coq se distinguent, en outre, des plumes femelles par l'organisation des barbes qui, vers l'extrémité de la plume et sur leur bordure, sont dépourvues de barbules.

Pour les rémiges secondaires, la différence entre les formes mâle et femelle est uniquement pigmentaire ; de couleur marron chez le Coq, elles sont, chez la Poule, à miroir gris tigré. Les plumes de la gorge sont noires chez le Coq et celles de la Poule, jaune marron clair. La féminisation de ces diverses zones est réglée par des seuils variables selon les régions du plumage ; les différences de sensibilité ont pu être précisée par F. CARIDROIT (1935), dans son étude sur l'action du benzoate de folliculine ; cet auteur est arrivé à les classer de la façon suivante :

Seuil dorso-lombaire < seuil de la couverture des ailes < seuil du camail < seuil de la gorge < seuil des rémiges secondaires, c'est-à-dire que la région la plus sensible est la région dorso-lombaire, la moins sensible celle des rémiges secondaires.

Ces résultats ont confirmé ceux obtenus lors d'une féminisation progressive par greffe ovarienne (PEZARD, SAND et CARIDROIT, 1925).

CARIDROIT a réussi, à diverses reprises, à mettre en évidence la dissociation entre un « seuil morphologique » quantité d'hormone suffisante pour déterminer la forme femelle de la plume, et un « seuil pigmentaire », quantité d'hormone suffisante pour réaliser la pigmentation femelle de la plume. Il a réussi à obtenir des plumes à pigmentation spéciale, de forme femelle, mais de pigmentation parfois très éloignée des pigmentations neutre et femelle. Il leur a donné le nom de « Pigmentation transitoire », ce qui ne veut nullement dire qu'elle est intermédiaire entre les pigmentations mâle et femelle. Chez les Chapons Leghorn doré, le pigment transitoire acajou apparaît nettement sur les ailes et le dos. Dans ses études de génétique expérimentale, V. REGNIER (1937), a tiré un grand parti de cette notion.

F. CARIDROIT (1935), a pu établir, pour les plumes présentant ce phénomène, les inégalités suivantes : seuil du pigment femelle > seuil du pigment transitoire > seuil morphologique femelle. Ce caractère « pigment transitoire » se transmet dans les croisements comme un caractère mendélien, ainsi que l'a observé V. REGNIER (1935) dans un croisement entre Combatant Indien et Leghorn doré.

Quand les seuils morphologique et pigmentaire, comme c'est le cas pour la race Leghorn doré, sont assez éloignés, on peut, en partant d'un Chapon, et par injection de doses croissantes de substances hormonales, obtenir ces différents stades : plumage de forme et de pigmentation neutres, puis plumage de forme femelle avec pigmentation transitoire, enfin, plumage de forme femelle avec pigmentation femelle typique.

La sensibilité varie beaucoup d'une race à l'autre et d'un

individu à l'autre. La moyenne de sensibilité, qui se traduit par une modification unique de l'axe des plumes de la gorge par exemple est, pour la race Leghorn doré, de 300 à 400 γ d'œstrone en dose unique. Des injections journalières, pendant plusieurs jours consécutifs, sont plus efficaces. L'efficacité augmente de même avec d'autres formes d'hormone œtogène, notamment avec les esters.

Il nous a paru indispensable de rappeler ces importantes notions, car elles vont nous servir par la suite à exprimer de façon précise les résultats auxquels nous avons abouti.

TEST DE LA CRETE DU CHAPON

Normalement, la crête du Coq est épaisse et droite. Celle de la Poule est tombante et plus mince, subissant des variations saisonnières importantes; elle devient en effet plus développée, plus rutilante au moment de la ponte. La crête du Chapon est petite, pâle et farineuse; de même, celle de la Poule ovariectomisée. Sous l'influence des hormones mâles, la crête du Chapon rougit et s'accroît dans toutes ses dimensions.

Cette notion a été établie par les expériences de castration et de greffe qui ont été réalisées, chez les Gallinacés, par PEZARD (1911-1918). Il a obtenu un test biologique très simple, basé sur la croissance de la crête du Chapon, ce qui a permis ultérieurement l'isolement des hormones mâles. Nous avons vu, à la Station Physiologique, F. CARIDROIT déceler ainsi des quantités de l'ordre de 10 γ de testostérone. La mesure de la surface toujours très délicate est sujette aux mêmes erreurs que celle de la longueur. Nous nous sommes donc borné, comme l'avaient fait PEZARD et CARIDROIT, à la mesure de celle-ci.

TEST DES VESICULES SEMINALES DE RAT IMPUBERE

Les vésicules séminales sont particulièrement développées chez les Rongeurs où elles atteignent des dimensions relative-



FIG. 3.
Vésicule séminale d'un Rat mâle normal.
Cellules épithéliales à cytoplasme abon-
dant avec noyau basal.
(Microphoto — Gross, 400).



FIG. 4.
Vésicule séminale d'un Rat mâle castré.
Epithélium aplati.
(Microphoto — Gross, 400).

ment considérables. Elles s'atrophient rapidement sous l'effet de la castration.

Elles sont employées comme test biologique des substances hormonales.

Les vésicules séminales sont constituées par du tissu conjonctif, du tissu musculaire lisse et un épithélium. Après la castration, tous les tissus s'atrophient. Les changements de l'épithélium sont particulièrement nets : les cellules s'aplatissent, le noyau est plus petit et plus foncé.

Les vésicules séminales du Rat impubère ont un épithélium semblable à celui observé chez l'adulte castré.

Si nous faisons agir des hormones du groupe testostérone-androstérone sur les Rats castrés ou impubères (rats de 30 à 60 gr.), les vésicules séminales se développent. L'épithélium a des cellules plus hautes et la lumière de la glande se remplit de sécrétion.

Les hormones œstrogènes provoquent bien aussi l'augmentation de poids des vésicules séminales, mais l'étude histologique montre que l'épithélium n'est pas sécréteur, qu'il y a seulement hypertrophie du tissu conjonctif et musculaire. Un traitement prolongé amène une métaplasie de l'épithélium qui envahit les tissus sous-jacents (KORENCHEWSKY et DENNISON, 1935 ; A. FISCHER, 1938).

Les divers principes œstrogènes ne possèdent pas quantitativement la même action sur les voies génitales mâles (DAVID, FREUD et de JONGH, 1936). Certaines ne réagissent pas, tels : l'équiline, le benzoate de folliculine, le monométhylœstradiol. Les vésicules ne sont que légèrement influencées par la folliculine et l'œstriol ; d'autres, enfin, ont une action très grande, comme l'équiline réduite, l'œstradiol ou dihydrofolliculine, son monobenzoate et son diacétate. C'est ainsi que ces dernières substances, selon les récents et remarquables travaux de DEANESLY (1938), ont une action, sur les vésicules séminales du rat, quatre fois plus grande que celle de l'œstrone.

CHAPITRE IV

RESULTATS EXPERIMENTAUX OBTENUS AVEC L'ŒUF

I. — TESTS FEMELLES

I. — Test vaginal de la rate castrée.

IMPORTANCE DE LA FÉCONDATION SUR LA TENEUR DE L'ŒUF EN SUBSTANCES ŒSTROGÈNES. — Selon les techniques que nous avons exposées précédemment, nous avons, au début de notre travail, fait les extraits d'œufs provenant, d'une part, des poulaillers de la Station physiologique, et, d'autre part, d'œufs achetés dans le commerce.

Les lots que nous traitions séparément étaient homogènes, c'est-à-dire que les œufs traités ensemble provenaient d'un même poulailler.

Nous nous sommes aperçu que certains d'entre eux ne donnaient que des résultats négatifs, bien que la méthode d'extraction soit toujours la même. En recherchant les causes de cette divergence, nous avons remarqué que les œufs sans substance œstrogène provenaient d'un poulailler où le Coq était malade depuis plusieurs semaines. Les œufs, mis à la couveuse, restaient clairs. Comme il en était de même chaque fois qu'un poulailler nous avait fourni des œufs sans substance œstrogène, nous avons donc étudié systématiquement la question.

A. — Œufs vierges.

a) ŒUFS DU POULAILLER 5.

Dans ce poulailler, il y avait trois Poules Leghorn doré et un Coq Leghorn doré malade. Nous avons, tout d'abord, fait l'extraction à partir d'un œuf. La totalité de l'extrait, injectée à une rate sensible à 4 γ , ne produisit aucun résultat.

Les œufs de ce poulailler, mis à la couveuse, étaient tous clairs. Nous fîmes alors une nouvelle extraction sur cinq œufs. Les injections furent faites successivement à des doses correspondant à un demi-œuf, puis à un œuf, puis à deux œufs. Ces épreuves, faites sur des Rates étalonnées, sensibles à 4 γ d'œstrone, furent toutes négatives, ce qui nous a permis d'en déduire que la quantité de substances œstrogènes par œuf vierge était inférieure à 2 γ , si toutefois ces substances existaient.

b) ŒUFS DU POULAILLER 18.

Celui-ci contenait deux Poules et un Coq, hybrides Leghorn doré $\times$ Andalou blanc. Le Coq était malade. Les œufs, mis à la couveuse, se révélèrent clairs. L'essai sur nos Rates, à une dose équivalente à un œuf entier, nous conduisit, comme les précédents, à un résultat négatif.

c) ŒUFS DE POULES SEBRIGHT SANS COQ.

Cette expérience fut faite avec sept œufs. Une quantité d'extrait, correspondant à un œuf entier, injectée à une Rate sensible à 4 γ , ne déclanche pas l'œstrus.

d) ŒUFS DE POULES SEBRIGHT AVEC COQ.

L'incubation révèle que les œufs de ce poulailler étaient, les uns clairs, les autres fécondés. Dix œufs traités ensemble montrèrent en moyenne une teneur de 5 à 6 γ par œuf. Nous avons traité alors les œufs de ce poulailler, un par un, et nous trou-

vâmes, pour les uns absence de substances œstrogènes (moins de 4 γ) et pour les autres une teneur de 20 γ . Nous nous expliquâmes alors la faible teneur de l'ensemble qui devait contenir une proportion voisine de 3 œufs fécondés pour 10, comme le révélait d'ailleurs l'incubation.

e) ŒUFS DE TOURTERELLES.

Les œufs incubés artificiellement ou naturellement étaient clairs au moment de notre expérience (mars 1938). La recherche des substances œstrogènes aboutit de même à un résultat négatif.

B. — Œufs vierges maintenus à la température d'incubation.

L'œuf est une cellule qui se trouve à l'état de vie ralentie. Nous nous sommes demandé si, en le mettant à la température d'incubation, donc dans des conditions où le métabolisme cellulaire serait plus actif, il n'y aurait pas transformation de stériles en substances œstrogènes.

Nos expériences faites sur des œufs maintenus de 5 à 12 jours dans la couveuse, n'ont pas produit d'œstrus sur des rates sensibles à 4 γ . Cette expérience était à tenter, car certains auteurs pensent que l'on peut trouver des œufs d'oiseaux avec un début de développement parthenogénétique.

C. — Œufs fécondés de Poules.

a) RÉSIDU.

Pour 6 jaunes (correspondant à environ 100 gr.), nous avons obtenu, par notre méthode extractive, un résidu inférieur à 0 gr. 10 : ce résidu provenait de la solution éthérée, après distillation de l'éther et dessiccation dans le vide.

b) BLANC DE L'ŒUF.

Au début de nos expériences, nous avons traité une douzaine d'œufs avec leur blanc (race Leghorn doré) puis uniquement des jaunes de même provenance. Dans l'un et l'autre cas,

nous avons obtenu les mêmes résultats. Donc, nous pouvons conclure que le blanc ne contient pas de substances œstrogènes en quantité appréciable.

c) SUBSTANCES ŒSTROGÈNES DU VITELLUS.

Ne pouvant exposer ici dans le détail toutes les expériences faites au cours de nos recherches, nous nous bornerons à en citer avec précision quelques-unes.

- 28 Mars 1938. — Provenance : race Rhode Island. — Extraction *sans* hydrolyse à partir de 3 jaunes. Poids des 3 jaunes : 60 gr. Dates de ponte des œufs : 1^{er} mars, 3 mars, 1^{er} mars. Teneur moyenne : 30 à 35 γ par œuf.
- 29 Mars 1938. — Provenance : race Rhode Island. — Extraction *avec* hydrolyse à partir de 3 jaunes. Poids des 3 jaunes : 58 gr. Dates de ponte des œufs : 4 mars, 12 mars, 13 mars. Teneur moyenne : 28 à 33 γ par œuf.
- 31 Mars 1938. — Provenance : race Light Sussex. — Extraction *avec* hydrolyse à partir de 4 jaunes. Poids des 4 jaunes : 68 gr. Dates de ponte des œufs : 13, 14, 15 et 17 mars. Teneur moyenne : 27 à 32 γ par jaune.
- 4 Avril 1938. — Provenance : race Light Sussex. — Extraction *sans* hydrolyse à partir de 3 jaunes. Poids des 3 jaunes : 52 gr. Dates de ponte des œufs : 16, 18 et 21 mars. Teneur moyenne : 28 à 33 γ par jaune.

L'ensemble de nos recherches porte sur un total de 250 œufs environ, les uns provenant du commerce, les autres de la Station Physiologique elle-même. Chaque lot fut soumis à un essai préliminaire de pourcentage de fécondité par mise en incubation de 10 % du lot. Les œufs de la Station furent vérifiés de leur côté au cours des incubations nécessitées par notre étude ultérieure sur les embryons.

Un certain nombre d'œufs ont été traités un par un ; nous avons toujours trouvé pour chacun d'eux la même quantité de substances œstrogènes. Il est donc impossible de faire deux lots de ces œufs et, par conséquent, il ne semble pas qu'avant leur développement, les œufs devant donner naissance à un embryon mâle aient plus de substances œstrogènes que ceux donnant un embryon femelle ou inversement. En tout cas, la différence, si elle existe, ne porterait que sur 4 ou 5 γ .

La race de la Poule n'intervient pas, si le poids des œufs est comparable. Par contre, il semble qu'il y ait une influence du poids du vitellus sur la quantité de substances œstrogènes comme le montrent les expériences suivantes.

D. — Œufs fécondés d'autres oiseaux.

a) SEBRIGHT. — Nous commencerons par rappeler que nos recherches sur les œufs de Sebright nous ont conduit à déceler chez les œufs fécondés un taux de 20 à 22 γ pour chacun d'eux; le poids du vitellus oscillait de son côté entre 12 gr. et 12 gr. 50.

b) PIGEONS. — Le vitellus de l'œuf de pigeon pèse 4 gr. environ. Sa teneur en substances œstrogènes est comprise entre 6 et 8 γ par jaune.

c) TOURTERELLES. — Nos essais ont porté sur 6 œufs fécondés, traités en deux fois (respectivement 2 et 4 œufs). Le poids d'un vitellus ne dépasse pas 2 gr. ; son pouvoir œstrogène est seulement de 3 à 4 γ .

d) CANES. — Les œufs de ces oiseaux nous ont permis de déceler dans leur vitellus une teneur voisine de 50 γ pour un poids de 25 gr. environ.

E. — Conclusions.

Ainsi, ces divers résultats nous conduisent naturellement à envisager un rapport entre le poids des vitellus et la teneur correspondante en substances œstrogènes. En effet, si nous considérons le rapport :

Teneur moyenne en substance œstrogène		
Poids moyen du jaune correspondant	nous trouvons :	
Poules ordinaires	31/17 =	1,82
Poules Sebright	22/12 =	1,83
Pigeons	4/7 =	1,75
Tourterelles	3,5/2 =	1,75
Canes	50/26 =	1,90

Le rapport est donc sensiblement constant et compris entre 1,75 et 2.

Le tableau ci-dessous donne le résumé de l'ensemble de nos résultats.

Espèces ou Races	Poids moyen d'un jaune	Quantité de substance œstrogène par œuf
		équivalente en γ d'œstrone
Leghorn	17 à 18 gr.	18 à 33 γ
Rhode Island	17 à 19 gr.	28 à 36 γ
Light Sussex	17 à 18 gr.	27 à 34 γ
Sebright	12 à 12 gr. 50	20 à 24 γ
Cane	25 gr.	48 à 52 γ
Pigeon	4 gr.	6 à 8 γ
Tourterelle	2 gr.	3 à 4 γ

F. — Origine de la substance œstrogène de l'œuf.

Il ne semble pas que les substances œstrogènes de l'œuf fécondé soient en rapport avec celles du sang de la Poule, comme l'indique d'ailleurs les œufs vierges. Nous avons eu la curiosité d'augmenter par des injections de folliculine la teneur en substances œstrogènes de quelques poules. Ces injections furent poursuivies pendant une temps assez long, comme l'on peut s'en rendre compte ci-dessous :

Poule Leghorn 823. — Injection de 1 mmgr. de benzoate d'œstradiol par semaine, du 20 novembre 1937 au 22 janvier 1938. Arrêt jusqu'au 21 février, puis injection de la même dose du 21 février au 9 mars 1938. Ensuite, injection de 2 mmgr. par semaine du 9 au 19 mars 1938.

Poule Leghorn 836. — Injection de 1 mmgr. de benzoate d'œstradiol par semaine du 20 novembre 1937 au 9 mars 1938 sans interruption. Ensuite, injection de 2 mmgr. par semaine du 9 au 19 mars 1938.

A cette date, elles se mirent à pondre et ce furent ces œufs dont nous nous sommes servis. Elles occupaient seules un poulailler avec un Coq Leghorn doré malade. Les œufs étaient vierges et, malgré le traitement prolongé que les poules

avaient subi, nous n'avons décelé aucune substance œstrogène dans le vitellus.

G. — Nature de la réaction vaginale.

Le frottis vaginal donne des indications positives ou négatives qui n'intéressent que les couches superficielles du vagin.

Nous avons voulu connaître la nature de la modification de l'ensemble de la muqueuse et fait l'expérience suivante.

A deux Rates qui réagissent à 8 γ d'œstrone, nous injectons des extraits vitellins correspondant l'un à 12 γ et l'autre à 20 γ de substances œstrogènes. Quand nous eûmes obtenu un frottis vaginal nettement positif, nous avons sacrifié les deux animaux et, après dissection, leur vagin fut fixé au Bouin.

L'examen microscopique des coupes vaginales de ces Rates nous a permis de connaître les modifications survenues dans la structure de la muqueuse, modifications qui correspondaient en tous points au stade même de l'œstrus ; à l'examen au faible grossissement, on observe un ruban foncé, épais et caractéristique correspondant à la muqueuse ; au fort grossissement, on aperçoit, successivement, en allant de l'intérieur vers l'extérieur, plusieurs assises de cellules en desquamation, puis des cellules cornées, ensuite plusieurs couches de cellules en voie de kératinisation, suivies d'une assise plus profonde ou couche basale (cf. fig. 7).

2. — Action sur l'utérus.

La dissection des Rates de l'expérience précédente nous a donné des renseignements sur l'utérus et la possibilité de faire l'étude histologique de cet organe.

Son aspect permettait déjà de prévoir une modification profonde. Sous l'effet des injections d'extraits vitellins, l'utérus était devenu plus volumineux ; des capillaires couraient à sa surface. L'augmentation de poids était importante ; alors que l'utérus d'une Rate ovariectomisée pèse en moyenne

35 mgr. celui de la Rate qui avait reçu une quantité d'extrait vitellin équivalent à 12 γ d'œstrus atteignant 95 mgr. (Poids de l'animal = 177 gr.) et l'utérus de la Rate qui reçut l'équivalent de 20 γ d'œstrone atteignait 130 mgr. (Poids de l'animal = 190 gr.). Ce dernier organe était rempli de sécrétion qui le rendait turgide.

L'étude histologique nous a permis de constater une hypertrophie de toutes les couches : les cellules de la muqueuse sont cylindriques, hautes, à noyau basal assez clair ; le myomètre est assez épais ; les cellules de l'épithélium des glandes ont subies les mêmes modifications que celles de la muqueuse ; la sécrétion est assez abondante (cf. fig. 5 et 6).



FIG. 5.

Coupe de l'utérus d'une Rate castrée ayant reçu une dose d'extrait vitellin équivalente en pouvoir œstrogène à 20 γ d'œstrone.

(Gross, 25).

En résumé, l'action de nos extraits vitellins sur le vagin et sur l'utérus déclenche des réactions nettement positives.

Le vagin a nettement la structure qui correspond à celle de l'œstrus naturel. Cela est d'autant plus remarquable qu'une seule dose (soit l'équivalent de 12 γ ou de 20 γ d'œstrone) a

suffi. Notre produit semble même plus actif, c'est-à-dire semble produire une modification structurale beaucoup plus profonde que l'œstrone même. D'après Korenchewsky, ce n'est qu'avec des injections journalières répétées de 30 γ d'œstrone que l'on pourrait obtenir une kératinisation semblable à celle de l'œstrus naturel.



FIG. 6.

Coupe de l'utérus d'une Rate ayant reçu une dose d'extrait vitellin équivalente en pouvoir œstrogène à 20 γ d'œstrone. Cellules de la muqueuse cylindriques et hautes à noyau basal.

(Gross. 400).

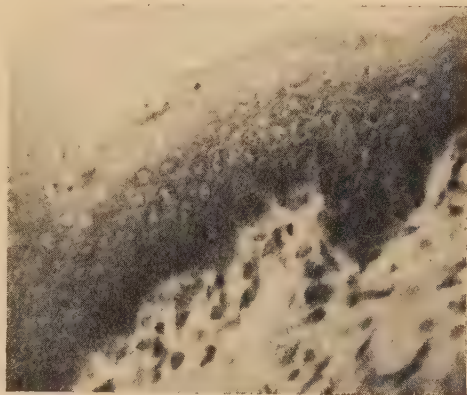


FIG. 7.

Coupe du vagin d'une Rate en œstrus sous l'action d'extrait vitellin.

Sur l'utérus, nous avons aussi une remarquable différenciation et, aussi sur cet organe, l'extrait vitellin semble bien supérieur à l'œstrone.)

Des injections répétées de cette hormone pure, n'amènent l'organe qu'au stade correspondant au diœstrus, tandis qu'une injection unique de nos extraits cause une distension par sécrétion de liquide qui caractérise le début de l'œstrus.

3. — Action sur le plumage du chapon.

Le plumage du Chapon est beaucoup moins sensible à l'action des hormones que le vagin de la Rate castrée ; aussi, l'emploi de ce test nécessite-t-il une quantité beaucoup plus grande de substance.

Nos recherches ont porté sur l'étude des modifications du plumage dans les races Sebright argenté et Leghorn doré.

Chez la race Sebright, le Coq présente la curieuse propriété d'avoir le même plumage que la Poule ; ses plumes sont arrondies, blanches liserées de noir, et la queue est celle de la Poule ; le testicule agit donc sur le plumage à la façon d'un ovaire. La castration fait apparaître des plumes effilées en forme de lancettes et des faucilles (MORGAN, PÉZARD, SAND, CARIDROIT).

L'injection de folliculine provoque la féminisation de la plume qui devient arrondie ; de même, l'injection d'une hormone mâle détermine le même résultat sur le plumage (DEANESLY et PARKES ; CHAMPY, 1937 ; CARIDROIT, 1937), mais modifié l'aspect de la crête qui, de petite, pâle et farineuse, devient rouge, volumineuse et rutilante.

Nous avons injecté une dose d'extrait équivalent à 30 γ d'œstrone (correspondant à un œuf), pendant 6 jours consécutifs au Chapon Sebright 772. Celui-ci avait subi un déplumage partiel du dos, quinze jours auparavant, et, au moment de l'injection, les bourgeons commençaient à apparaître. La crête n'a jamais changé d'aspect, elle est restée neutre. Nous avons constaté, par contre, une *féminisation de la plume* dans la partie des bourgeons ayant poussé sous l'influence de nos injections. Ces bourgeons ont repris ensuite l'aspect neutre caractéristique qu'ils avaient avant l'injection de nos extraits vitellins.

Étant donné les modifications du plumage particulières aux Sebright qui réagit de la même façon à l'hormone mâle et à l'hormone femelle, il était bon de poursuivre nos recherches sur des Chapons Leghorn doré où la variété de pigmentation des plumes pouvait nous conduire à des observations intéressantes.

La sensibilité de ces Chapons étant beaucoup moins grande que celle des Sebright, nous avons dû utiliser une grande quantité d'œufs (200 environ) pour ces recherches. Les extraits vitellins obtenus furent préalablement titrés à l'aide de nos Rates étalonnées en œstrone.

Chapon 824. — Plumage de ♂ Leghorn doré clair.

Déplumage 8 jours avant la première injection : dos, aile droite, gorge à droite. Injection quotidienne correspondant à 8 jaunes pendant 8 jours consécutifs. Le plumage pousse mâle et nous n'avons observé aucune modification dans la forme ou la pigmentation des bourgeons sous l'effet de nos injections.

Chapon 833. — Plumage de ♂ Leghorn doré clair.

Devant le résultat négatif précédent, nous avons alors injecté des doses plus fortes d'extrait vitellin après déplumage du dos et du camail. Ces injections furent faites pendant neuf jours consécutifs à la dose quotidienne correspondant en pouvoir œstrogène à 300 γ d'œstrone. Au moment de cette opération, les bourgeons du dos avaient une longueur comprise entre 3 et 4 cm. Nous avons alors obtenu des plumes présentant une modification morphologique dans le sens femelle, c'est-à-dire un élargissement de la partie barbulée de la lancette ; mais la modification pigmentaire s'est traduite par une disparition du pigment noir de la partie centrale de la plume sans formation du pigment caractéristique de la Poule. A l'aspect microscopique, on distingue nettement la modification du rachis dans le sens d'un élargissement et la diminution de la mélanine dans les barbules dont les crochets persistent. Une ligne foncée visible sur la plume au début de la réaction est due à un simple phénomène physique provoqué par une torsion générale des barbes à cet endroit, et non par une modification pigmentaire comme on pourrait le croire à première vue. Nous nous trouvons donc dans ce cas en face d'une « réaction de seuil ».

La sensibilité étant variable suivant chaque sujet utilisé, nous avons opéré dans les mêmes conditions et sur le même Chapon avec une solution de 300 gr. d'œstrone. Nous avons



FIG. 8. — PLUMES DU DOS.

1. Plume normale témoin; 2 et 3. Bourgeons ayant subi l'action des extraits vitellins. Au-dessus de a: partie du bourgeon poussée avant les injections; entre a et b: partie des bourgeons caractérisée par la disparition du pigment noir de la partie centrale de la plume sous l'action des extraits vitellins.

(Réaction de seuil).

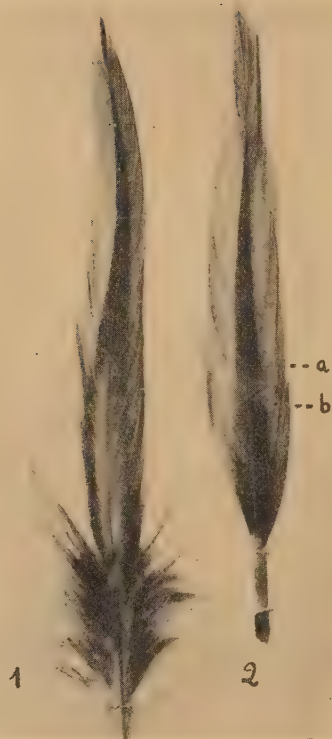


FIG. 8 bis. — PLUMES DU CAMAIL.

1. Plume normale témoin; 2. Bourgeon ayant subi entre a et b une modification pigmentaire sous l'action des extraits vitellins.

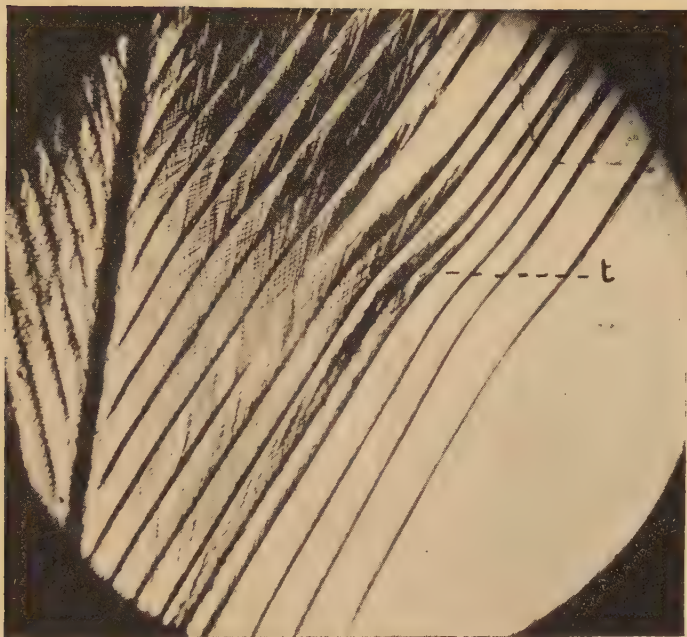


FIG. 8 ter.

PLUMES DU DOS A UN FAIBLE GROSSISSEMENT
(Ocul. 4, obj. 1).

En t: torsion générale des barbes correspondant au début de la réaction. Au-dessus, présence du pigment noir normal. Au-dessous, diminution considérable de ce pigment dans les barbules dont les crochets persistent.

constaté aucune modification dans la forme et la couleur du plumage. Ainsi, notre extrait vitellin a une action que l'œstrone pure n'a pas lorsqu'elle est administrée à une dose équivalente en pouvoir œstrogène, calculé d'après la réaction vaginale de la Rate castrée.

II. — TESTS MALES

I. — Action sur la crête du chapon.

Au cours de nos expériences sur le plumage du Chapon, nous avons chaque fois mesuré avec soin la crête du castrat employé. Dans aucun cas, nous n'avons pu observer de modification dans la couleur ou la longueur de la crête. Cette constatation ne suffisait pas à prouver l'absence dans l'œuf de substances actives sur la crête du Chapon. Car, dans notre méthode générale d'extraction, la solution sodique provenant de la saponification de l'extractum chloroformique est acidifiée avant d'être traitée par l'éther. Or, étant donné les propriétés des hormones mâles, celles-ci, qui se trouvent également dans la solution sodique, ne peuvent passer dans l'éther qu'en milieu alcalin comme les substances hormonales féminisantes.

Aussi, nous appuyant sur cette différence de propriété, nous avons légèrement modifié, dans ce cas, notre technique : la solution sodique, au lieu d'être acidifiée, est traitée directement par l'éther qui entraîne les substances masculinisantes. Le résidu éthéré est alors repris par de l'huile d'olive neutralisée. Cette méthode a de plus l'avantage de pouvoir, avec les mêmes œufs, extraire les substances hormonales féminisantes, car il suffit, après l'extraction éthérée alcaline, d'acidifier la liqueur restante et de traiter de nouveau par l'éther selon la méthode générale indiquée au début de cet ouvrage.

Nous avons injecté au Chapon Leghorn 833, pendant neuf jours consécutifs, une quantité journalière équivalente à 10 œufs fécondés de nos extraits supposés masculinisants. Ja-

mais nous n'avons observé de croissance ou de rougeur persistante de la crête du Chapon (47 mm.) pendant le temps des injections ou ultérieurement.

Nous sommes donc conduit à conclure que la présence de substances hormonales masculinisantes dans le vitellus de l'œuf nous semble très problématique. En tout cas, si elles existaient, ce ne pourrait être qu'à des concentrations très faibles difficilement décelables par les méthodes de dosage actuellement en usage.

2. — Action sur les vésicules séminales.

Pour étudier les modifications structurales des vésicules séminales du Rat, nous avons employé une méthode comparative. Nous nous sommes servi d'un lot de 4 jeunes Rats castrés de même âge.

Rats, nés le 19 septembre 1938, castrés le 5 novembre. L'un



FIG. 9.
*Vésicule séminale de Rat impubère castré.
Faible développement de tous les tissus.
(Gross. 25).*

d'eux servant de témoin, les trois autres furent injectés le 15 novembre, pendant 9 jours consécutifs; ils reçurent respectivement une dose journalière d'extrait vitellin (équivalent à 30 γ d'œstrone), de 30 γ d'œstrone et 15 γ de propionate de testostérone. L'autopsie fut faite le jour suivant la



FIG. 10.

Vésicule séminale de Rat infantile castré, ayant reçu 30 γ d'œstrone par jour, pendant neuf jours consécutifs. Léger développement des tissus conjonctif et musculaire.

(Gross, 25).

dernière injection. Les vésicules séminales furent alors étudiées histologiquement.

Les vésicules séminales du Rat impubère castré (rat témoin) ont un faible développement de tous les tissus constituant ; l'épithélium en particulier est aplati, le noyau est très foncé et le cytoplasme peu abondant (fig. 9).

Sous l'effet du propionate de testostérone, tous les tissus se développent, mais les changements épithéliaux sont les plus



FIG. 11.

Epithélium de la vésicule séminale d'un Rat infantile castré ayant reçu 15 γ de propionate de testostérone par jour pendant neuf jours. Cellules élevées.

(Microphoto — Gross. 400).

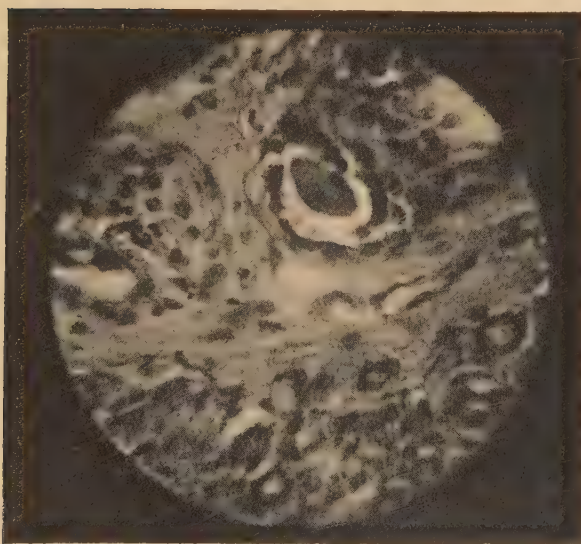


FIG. 12.

Vésicule séminale de Rat infantile castré ayant reçu 30 γ d'œstrone par jour, pendant neuf jours consécutifs. Léger développement des tissus conjonctif et musculaire.

(Gross. 400).

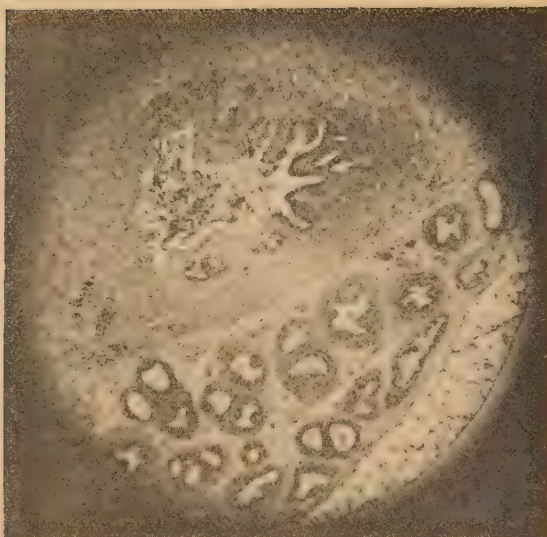


FIG. 13.

*Vésicule séminale d'un Rat infantile castré
ayant reçu pendant neuf jours consécutifs
une dose d'extrait vitellin, correspondant
en pouvoir œstrogène à 30 γ d'œstrone.
Modification des tissus mésenchymateux
voisine de l'action de l'œstrone.
(Gross. 25).*



FIG. 14.

*Vésicule séminale d'un Rat infantile castré
ayant reçu pendant neuf jours consécutifs
une dose d'extrait vitellin, correspondant
en pouvoir œstrogène à 30 γ d'œstrone.
Modification des tissus mésenchymateux
voisine de l'action de l'œstrone.
(Gross. 400).*

faciles à apprécier. La cellule devient haute et cylindrique, le noyau est plus clair. La sécrétion est abondante (fig. 11).

L'œstrone agit surtout sur le tissu conjonctif et le tissu musculaire lisse, mais son action n'est vraiment bien évidente qu'après un traitement prolongé (fig. 10 et 12).

Avec nos extraits vitellins, nous n'avons pas obtenu la modification épithéliale mâle et c'est surtout les tissus mésenchymateux qui se sont légèrement modifiés comme sous l'action de l'hormone femelle pure (fig. 13 et 14).

L'emploi de ce test plus sensible que la crête du Chapon à certains composés hormonaux mâles, nous permet de conclure avec plus de certitude à l'absence de substances masculinisantes dans nos extraits.

CHAPITRE V

DISCUSSION DES RESULTATS

Les diverses expériences et observations que nous venons d'exposer nous permettent de tirer quelques conclusions.

Il existe certainement dans l'œuf de Poule des substances œstrogènes, ce qui confirme les résultats de FELLNER (1925), MORELL (1930), GLIMM et WADEHN (1930). Ces substances se trouvent dans les jaunes, ainsi que nous l'avons constaté en étudiant plus de 250 œufs, à une concentration équivalente en pouvoir œstrogène à 30 γ d'œstrone en moyenne par œuf; les différences constatées par l'emploi du test vaginal de la Rate sont par trop minimes pour pouvoir y distinguer deux lots, l'un capable de donner des embryons mâles, l'autre des embryons femelles.

Mais ces substances ne se rencontrent pas dans tous les œufs indistinctement. Nous n'avons pu, en effet, en déceler dans les œufs vierges (J. RIBOULLEAU, 1938); seuls, les œufs fécondés en contiennent.

Nous avons étendu nos recherches avec les œufs d'autres oiseaux. Les résultats obtenus confirmèrent ce que nous venons d'exposer et, de plus, firent ressortir que les différences observées avec les œufs fécondés des diverses espèces d'oiseaux tiennent vraisemblablement aux différences de poids du vitellus. En étudiant le rapport :

Teneur moyenne en substances œstrogènes

Poids moyen du jaune correspondant.

nous le trouvons en effet, toujours sensiblement constant et compris entre 1,75 et 2.

Nous nous sommes alors efforcé de préciser la nature de ces substances par l'emploi de tests biologiques. L'action positive obtenue sur le plumage des Chapons Sebright et Leghorn nous a confirmé que nous nous trouvions en présence de substances hormonales féminisantes. Nous avons en même temps obtenu le « seuil » de féminisation dans les deux races étudiées, ce qui nous a permis d'autre part d'observer qu'aux mêmes doses, l'action de l'œstrone pure différait de nos extraits vitellins.

Ceux-ci possèdent également une action sur les vésicules séminales et sur l'utérus des Rongeurs, action semblable à celle de l'œstrone, mais plus intense sur ces tests.

Nous pouvons, en somme, résumer de la façon suivante les caractères physiologiques de la substance inconnue contenue dans nos extraits; elle a toutes les propriétés de l'œstrone, mais elle est plus active que celle-ci sur l'utérus de la Rate castrée et sur le plumage du Chapon.

Tout en plaçant la ou les substances actives de nos extraits dans le même groupe que l'œstrone, on peut se demander si d'autres corps que ces hormones existeraient aussi, favorisant leur action.

Pour connaître la nature exacte de ces substances actives ou favorisantes, il faudrait réussir à les isoler et à en étudier séparément les propriétés, isolement très difficile à obtenir étant donné l'infime quantité contenue dans l'œuf et dont nous ne pouvions envisager la réalisation avec les moyens dont nous disposions.

Nous avons recherché la présence de substances masculinisantes et, pour cela, nous avons envisagé, après une extraction adéquate, l'action sur la crête du Chapon et sur les vésicules séminales du Rat. La présence de telles substances nous semble très problématique, tout au moins aux doses actives sur les tests (c'est-à-dire d'au moins l'équivalence de 10 γ de testostérone par jour). Comme nous avons expérimenté avec dix œufs par jour, *il n'y a pas l'équivalent de 1 γ de testostérone par œuf.*

L'origine des substances œstrogènes de l'œuf est-elle dans l'œuf lui-même ou bien peut-on penser à une influence du

soma de la pondeuse? L'expérience suivante nous permet d'affirmer que les substances féminisantes n'ont pas une origine extrinsèque, qu'elles ne s'emmagent pas au cours du développement du vitellus. L'injection, à très fortes doses, de folliculine à des Poules donnant des œufs vierges, ne nous a pas permis de déceler dans ces œufs la présence de substances œstrogènes. Celles-ci doivent donc se former après la fécondation, à partir des constituants du vitellus. Essayons d'envisager la transformation chimique qui serait susceptible de leur donner naissance. Etant donné notre mode d'extraction, nous avons dans nos extraits des corps voisins des stérides. Le type des stérides est le cholestérol; l'hormone mâle typique est la testostérone, les hormones femelles typiques sont l'œstradiol et l'œstrone.

Or, nous avons vu, dans la composition chimique de l'œuf de Poule, que le vitellus contenait une quantité assez importante de cholestérol (1,80 %), ce qui correspond par jaune à

$$\frac{1,80}{18} = 0 \text{ gr. } 10$$

Si l'on compare cette quantité à la teneur en substances œstrogènes, on voit que celle-ci est proportionnellement très

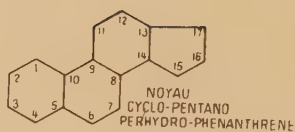
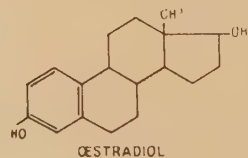
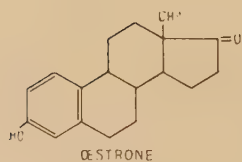
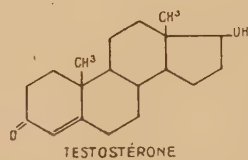
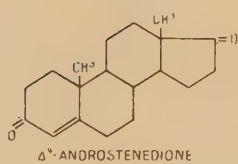
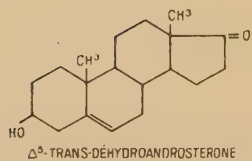
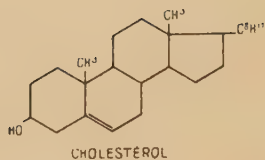
$$\text{faible, de l'ordre de } \frac{0 \text{ mgr. } 0 \text{ } 30}{100 \text{ mgr.}} = \frac{3}{10.000}$$

Les formules de tous ces corps ont un noyau commun cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène.

Les chimistes savent passer de l'un à l'autre avec facilité. On peut supposer que les cellules de l'embryon, qui est au stade blastula avant la ponte, transformeraient une infime partie du cholestérol en l'un de ces corps probablement voisin de l'œstrone.

Les chimistes ont d'ailleurs donné la suite des transformations permettant ce passage et que nous reproduisons dans le schéma suivant (p. 60).

Les transformations sont donc relativement peu considérables et comportent des déshydrogénations et la fixation d'oxydrile phénolique, réactions chimiques que la cellule pratique bien souvent dans d'autres cas. Cette hypothèse n'ex-



clut d'ailleurs pas du tout celle d'une synthèse directe aux dépens d'autres corps ternaires.

Si, avec un peu d'esprit finaliste, nous nous demandons la signification de cette présence d'un corps œstrogène, ou tout au moins à quelle fonction embryonnaire ou cellulaire correspond cette propriété, nous ne pouvons formuler aucune hypothèse vraisemblable pour l'instant, car nous ignorons en effet le mode d'action intracellulaire des hormones. Il y a donc autant de raisons d'admettre que c'est un hasard qui donne la fonction œstrogène à cette substance ou qu'elle conditionne un phénomène intra-embryonnaire non encore précisé.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

LES SUBSTANCES ŒSTROGENES DE L'ŒUF DE POULE AU COURS DE L'INCUBATION ET DANS L'EMBRYON

Il est impossible dans les œufs fécondés normaux de discerner et d'étudier séparément ceux qui produisent des embryons mâles ou des embryons femelles. Les résultats toujours concordants que nous avons obtenus, permettent de supposer qu'il ne doit pas exister de différence œstrogène entre eux. Il nous a paru intéressant de rechercher si cette similitude se maintenait et si des modifications n'apparaissaient pas pendant l'incubation en rapport avec le sexe ou la durée d'incubation.

Pour effectuer ces recherches, nous avons séparé les embryons de leur vitellus, afin de pouvoir trouver la proportion de substances œstrogènes dans chacune des parties de l'œuf incubé. Cette séparation ne peut être réalisée qu'après un certain temps d'incubation, lorsque l'embryon est suffisamment développé. Aussi, devons-nous envisager différemment le mode d'extraction selon le développement embryonnaire.

METHODES D'EXTRACTION HORMONALE

A. — Extraction après un début d'incubation.

A ce stade, où il n'est pas possible encore de discerner les sexes, nous avons utilisé le même mode général d'extraction

que pour les œufs fécondés normaux, en traitant l'ensemble du jaune en une seule fois.

B. — Extraction lorsque le sexe est discernable.

1° Distinction du sexe.

Au point de vue histologique, les ébauches gonadiques d'un embryon normal réalisent, entre le 7^e et le 9^e jour d'incubation, la ségrégation en deux sexes, chacun en accord avec le déterminisme génétique sexuel de l'œuf fécondé. Les ébauches d'un embryon génétiquement mâle ont la structure typique d'un testicule juvénile et celles d'un embryon génétiquement femelle réalisent la structure typique d'une ébauche ovarique, rudimentaire à droite, mais fonctionnant à gauche.

En conséquence, dès le 10^e jour d'incubation, les testicules d'un embryon normal ont l'aspect de deux minuscules lames réniformes de dimensions sensiblement égales. Par contre, l'embryon femelle se caractérise aisément par le développement assez considérable de l'ébauche gonadique gauche présentant la forme d'une lame assez épaisse, très claire. Celle-ci contraste vivement avec la couleur rougeâtre du mésonephros sur la face ventrale duquel elle est adossée, tandis que les ébauches gonadiques droites sont restées rudimentaires et à peine perceptibles.

Il est donc facile de distinguer avec certitude le sexe de l'embryon dès le milieu de l'incubation, en se basant sur les constatations que nous venons d'exposer.

2° Séparation de l'embryon et du jaune.

Pendant tout le cours de la vie embryonnaire, le poussin possède dans le jaune d'œuf une réserve alimentaire importante et ce n'est seulement qu'au dernier moment de la vie embryonnaire que cette provision, consistant encore dans

une portion considérable du jaune, est résorbée en partie par l'intestin. Une portion de vitellus persiste encore pendant les premiers jours de la naissance. D'ailleurs, plusieurs auteurs ont réussi, avec des moyens d'observation perfectionnés, à étudier pendant toute la durée de l'incubation non seulement les transformations de l'embryon et du jaune, mais, de plus, les divers stades de développement de tous les organes du futur poussin (ZING YANG KUO, 1932).

Il est donc très facile de séparer l'embryon du jaune à n'importe quel moment de l'incubation. Une simple coupure du cordon les unissant suffit à cet effet.

3° Extraction proprement dite.

Après ces opérations préliminaires, nous obtenons, pour chaque couvée étudiée, quatre parties distinctes : deux formées par les embryons mâles et femelles, et les deux autres par les jaunes correspondants.

Nous avons toujours opéré, dans chacun de ces cas, après hydrolyse de 8 heures, afin d'être certain d'agir sur tout l'embryon ainsi dissocié. Le résidu chloroformique est ensuite saponifié, comme dans notre méthode générale, quoique les matières grasses soient ici beaucoup moins considérables, une grande partie se trouvant déjà utilisée pour le développement de l'embryon. Après acidification et extraction par l'éther, on reprend par une quantité déterminée d'huile d'olive neutralisée afin d'obtenir une solution propre aux dosages physiologiques ; pour ceux-ci, nous avons utilisé le test vaginal de Rates castrées sensibles à 4 γ d'œstrone et recherché l'action sur le plumage du chapon.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A. — Avant que les gonades ne soient visibles.

Nos recherches ont porté sur une vingtaine d'œufs fécondés. Ceux-ci furent traités séparément et les extraits obtenus

furent dosés à l'aide de Rates étalonnées à 2 ou 4 γ d'œstrone. Dix œufs furent examinés au bout du 4^e jour d'incubation; les dix autres, après une huitaine de jours.

Dans tous les cas, nos dosages révélèrent une baisse considérable de la teneur en substances œstrogènes. Jamais nous n'avons pu y déceler une quantité supérieure à 10 γ , la moyenne courante étant comprise entre 4 et 8 γ . Ainsi les substances œstrogènes de l'œuf fécondé disparaissent rapidement dès le début de l'incubation, avant même le 4^e jour.

Cette baisse considérable persiste encore au 8^e jour, date à laquelle l'embryon ne fait que commencer réellement à se développer. La généralité de cette brusque diminution dès les premiers jours, permet de penser qu'elle se produit aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

B. — Les embryons femelles et leur vitellus.

Nous n'avons commencé à envisager la séparation des sexes qu'à partir du 12^e jour d'incubation, dès qu'aucune erreur n'est à craindre.

Nous avons utilisé les œufs du commerce ainsi que des œufs de races sélectionnées : Rhode Island, Brou, Light Sussex. Pour une même durée d'incubation, nous avons chaque fois opéré sur plusieurs couvées; les résultats obtenus sur le vagin de la Rate castrée, furent toujours concordants, quelle que soit la provenance des œufs. Voici, par exemple, ce que nous a indiqué l'étude des œufs de Light Sussex :

Douzième jour d'incubation :

6 embryons femelles. Poids des embryons : 15 gr.
Teneur en substance œstrogène : 3 à 4 γ par embryon,
8 à 10 γ par vitellus.

Seizième jour d'incubation :

5 embryons femelles. Poids des embryons : 45 gr.
Teneur en substance œstrogène : 6 à 7 γ par embryon,
6 γ par vitellus.

Dix-huitième jour d'incubation :

4 embryons femelles. Poids des embryons : 78 gr.

Teneur en substance œstrogène : 3 à 4 γ par embryon,
5 à 7 γ par vitellus.

Vingtième jour d'incubation :

4 embryons femelles. Poids des embryons : 114 gr.

Teneur en substance œstrogène : 3 à 4 γ par embryon,
2 à 4 γ par vitellus.

Ainsi, pendant tout le cours de son développement, l'embryon femelle, de même que son vitellus, possède une teneur en substances œstrogènes sensiblement constante.

C. — Les embryons mâles et leur vitellus.

1° Action sur le vagin de la rate castrée.

Nous avons opéré comme pour les embryons femelles. Si nous reprenons l'étude des mêmes couvées de Light Sussex, nous constatons les faits suivants :

Douzième jour d'incubation :

4 embryons mâles. Poids des embryons : 12 gr.

Teneur en substance œstrogène : 20 à 24 γ par embryon,
3 à 4 γ par vitellus.

Seizième jour d'incubation :

5 embryons mâles. Poids des embryons : 51 gr.

Teneur en substance œstrogène : 20 à 24 γ par embryon,
4 à 5 γ par vitellus.

Dix-huitième jour d'incubation :

4 embryons mâles. Poids des embryons : 83 gr.

Teneur en substance œstrogène : 3 γ par embryon,
3 à 4 γ par vitellus.

Vingtième jour d'incubation :

4 embryons mâles. Poids des embryons : 120 gr.

Teneur en substance œstrogène : 3 γ par embryon,
moins de 2 γ par vitellus.

Nous voyons donc que, contrairement aux embryons femelles, la teneur des embryons mâles subit des variations impor-

tantes: peu élevée jusqu'au 12^e jour, ainsi qu'il résulte de l'étude des œufs étudiés après un début d'incubation, cette teneur subit une brusque augmentation persistant pendant plusieurs jours (du 12^e au 18^e) avant de revenir à un taux sensiblement aussi faible qu'aux premiers jours d'incubation.

2° Action sur le plumage du chapon Sebright.

La proportion de substances œstrogènes contenue dans les extraits d'embryons femelles et dans les vitellus étant beaucoup trop faible pour nous procurer une quantité suffisante de produit, nous n'avons recherché que l'action des extraits d'embryons mâles sur le plumage du Chapon.

Le plumage du Sebright est, comme nous l'avons déjà vu, beaucoup plus sensible que celui du Chapon Leghorn; aussi, avons-nous utilisé comme test pour nos extraits embryonnaires le plumage du Chapon Sebright.

Chapon Sebright doré 802. — Déplumage partiel de l'aile et du dos (côté droit), le 13 décembre 1938. Injection journalière correspondant à 27 γ d'œstrone, le 20 décembre 1938, pendant huit jours consécutifs. Le même jour, déplumage partiel de l'aile et du dos (côté gauche).

En examinant, 15 jours après la dernière injection, les bourgeons du côté droit, une modification très nette dans la forme était visible. La zone de pousse correspondant à nos injections présentait une féminisation totale du dos et de l'aile avec le liséré noir caractéristique.

L'examen ultérieur des bourgeons poussés à gauche permit d'ailleurs de confirmer ce résultat; l'extrémité de tous ces bourgeons présentait, en effet, aussi, une féminisation totale (fig. 15 et 16).

Le manque d'extrait d'embryons mâles ne nous a pas permis de rechercher le seuil de féminisation de ce Chapon avec nos substances. Nous avons dû nous contenter d'étudier comparativement la sensibilité de ce Sebright à l'action d'hormo-

nes pures : C'est ainsi que le seuil de féminisation totale de ce Chapon par le benzoate d'œstradiol, a lieu pour une dose jour-

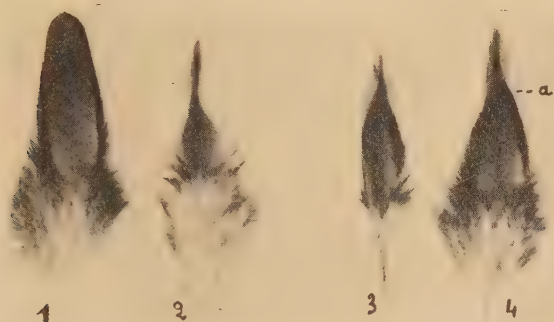


FIG. 15.

PLUMES DU DOS DE SEBRIGHT DORÉ

1. Plume femelle normale, arrondie, avec liséré noir. — 2. Plume neutre (après castration). — 3 et 4. Bourgeons ayant subi une féminisation totale sous l'action des extraits d'embryons mâles. — Au-dessus de a : forme neutre avant l'injection. Au-dessous de a : transformation complète en la forme femelle.

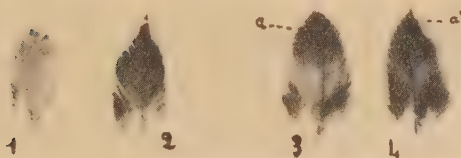


FIG. 16.

PLUMES DE L'AILE DE SEBRIGHT DORÉ

1. Plume femelle normale. — 2. Plume neutre. — 3 et 4. Plumes ayant subi une féminisation avec liséré noir en a et a', sous l'action des extraits d'embryons mâles.

nalière de 3 γ ce qui correspond comme action à une dose de 30 γ d'œstrone environ. La crête est restée stationnaire à l'état neutre.

CHAPITRE II

DISCUSSION DES RESULTATS

Nous avons constaté une disparition considérable des substances œstrogènes de l'œuf fécondé, dès le début de l'incubation. Cette diminution, s'appliquant à tous les œufs étudiés, conduit à penser qu'elle est générale pour les deux sexes. Elle persiste jusqu'au milieu de l'incubation.

A ce moment, il se produit dans les embryons mâles *seulement*, une brusque augmentation pendant plusieurs jours. Au 18^e jour, la teneur des embryons mâles est revenue au même taux qu'au début de l'incubation. Par contre, les embryons femelles ne révèlent aucune variation de cette importance. Les graphiques ci-dessous mettent ces faits en évidence (fig. 17 et 18).

Ainsi nous constatons un fait pour le moins inattendu et paradoxal : *l'embryon mâle, pendant une période déterminée d'incubation, contient beaucoup plus de substances œstrogènes que l'embryon femelle* (J. RIBOULLEAU, 1938).

La disparition des substances œstrogènes au début de l'incubation ne peut s'expliquer que par une modification dans la structure chimique de ces corps leur faisant perdre leurs propriétés œstrogènes et féminisantes, ou plus vraisemblablement par l'utilisation de ces substances dans la construction de l'embryon.

Mais comment s'expliquer l'apparition, chez l'embryon mâle seulement, de substances œstrogènes féminisantes pendant une certaine période d'incubation?

Examinons pour cela les phénomènes d'histogénèse chez l'embryon. Dès le début, l'embryon mâle possède un métabolisme déjà différent de l'embryon femelle. Chez le mâle, exis-

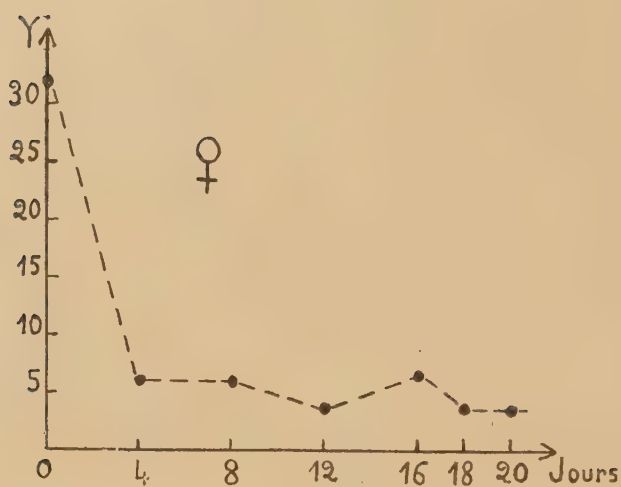


FIG. 17.

Courbe de variation de la substance œstrogène pendant l'incubation, dans l'embryon femelle.

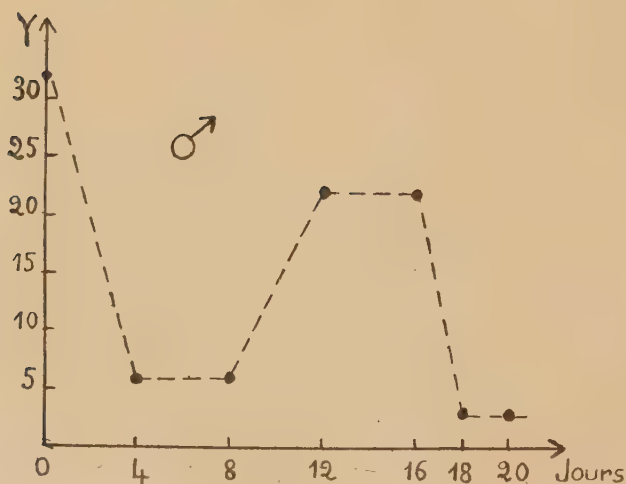


FIG. 18.

Courbe de variation de la substance œstrogène pendant l'incubation, dans l'embryon mâle.

tent deux gonades; chez la femelle, l'une d'elles s'est atrophiée.

Dès le 11^e jour, chez la femelle, se produit une dégénérescence des cordons de première poussée embryonnaire et une deuxième poussée de cordons épithéliaux; l'organisation se fait en follicules.

Par contre, chez le mâle, à partir du 12^e jour, les gonocytes sont dans les cordons et le 19^e jour les tubes séminifères sont constitués. C'est pendant cette période de grand travail d'organisation dans la gonade que se produit chez le mâle cette poussée œstrogène.

Si nous comparons la teneur de l'embryon mâle et du vitellus, nous voyons que ce dernier ne subit aucune répercussion des variations constatées chez l'embryon, ainsi que l'indique l'ensemble de nos recherches, résumé dans le tableau ci-après:

Période d'incubation	MALES			FEMELLES		
	Embryon	Vitellus	Total	Embryon	Vitellus	Total
12 ^e Jour.....	20-24 γ	3-4 γ	24-28 γ	3-4 γ	8-10 γ	12-13 γ
16 ^e Jour.....	20-24 γ	4-5 γ	24-28 γ	6-7 γ	6 γ	12-13 γ
	moins de					
18 ^e Jour.....	4 γ	3-4 γ	6-7 γ	3-4 γ	5-7 γ	8-11 γ
		moins de				
20 ^e Jour.....	3 γ	2 γ	4 γ	3-4 γ	2-4 γ	5-8 γ

Si nous envisageons l'augmentation globale des substances œstrogènes dans l'œuf mâle (embryon + vitellus), nous constatons que cette augmentation résulte de la forte teneur de l'embryon; le vitellus en contient toujours sensiblement autant qu'au 4^e jour d'incubation. Cette substance œstrogène de l'embryon ne provient donc pas du vitellus, mais résulte vraisemblablement d'une synthèse par les tissus de l'embryon mâle qui sont, durant cette même période, le siège d'une grande activité. Plusieurs auteurs ont, en effet, montré l'activité plus grande de synthèse dans tous les organes glandulaires vers le 10^e jour de l'incubation.

NEEDHAM (1926) étudia l'excrétion de l'azote par l'embryon de poulet. Dosant l'ammoniaque, l'urée et l'acide urique dans l'embryon, les membranes et les liquides pendant la durée du développement, il en arriva aux conclusions suivantes. Au début, l'acide urique est égal à 7 % de l'azote total ; au 10^e jour, il atteint 87 %. Inversement, l'ammoniaque, excrétée en quantité importante au début, représente seulement le 10^e jour 3 à 4 % de l'azote excrété. Cette variation qualitative des excréta azotés indique une plus grande activité du foie et des reins.

Pour les stérides, groupe qui nous intéresse particulièrement, le travail de ROFFO et AZARETTI (1926) sur « l'hypercholestérigénie chez l'embryon de Poulet en rapport avec son développement », montre qu'il y a surtout un processus de synthèse; leurs déterminations furent effectuées simultanément sur l'embryon et le reste du jaune d'œuf pendant le processus d'évolution embryonnaire.

D'après les recherches de SKARZYNSKI (1936) sur les échanges des stérides, la quantité de cholestérol varie beaucoup d'une Poule à l'autre; elle est sensiblement constante dans les divers œufs d'une même Poule. Dans l'embryon, elle est plus élevée que dans l'œuf non couvé; l'inverse s'observe pour l'ergostérol. La quantité de dihydrocholestérol ne paraît pas varier.

Tout récemment, ZORN et DALTON (1937), sur l'étude chimique du sang de Poulet en voie de développement, constatent que la concentration de cholestérol du sang augmente rapidement du 9^e au 18^e jour, puis diminue graduellement après cette élévation pour atteindre le taux de l'adulte à l'éclosion.

Remarquons le parallélisme de nos observations avec celles de ces auteurs, aussi bien en ce qui concerne la période d'augmentation pendant l'incubation que la diminution qui se produit au moment de l'éclosion. Ces substances œstrogènes sont probablement des substances de synthèse plutôt que des substances de dégradation du cholestérol. En effet, s'il y a synthèse de cholestérol du 9^e au 18^e jour de l'incubation, il est permis de penser qu'il en est de même pour les substances œstrogènes.

Si nous examinons les résultats obtenus sur *les embryons femelles*, nous remarquons qu'il y a globalement peu de variation depuis le 4^e jour de l'incubation. Le vitellus a toujours une teneur de même ordre de grandeur que dans l'embryon; nous ne retenons pas, en effet, une différence de 4 γ qui est de l'ordre d'erreur expérimentale.

Il faut donc penser que le métabolisme des stériles est déjà bien différent chez le mâle et chez la femelle.

Malheureusement, ZORN et DALTON, dans leur étude sur le sang de l'embryon, ne précisent pas le sexe des embryons qu'ils ont étudiés.

Si on admet que l'activité de synthèse des stérols en général est le même pour les deux sexes, on remarque que l'étape, stérol à caractère œstrogène, a disparu chez la femelle; ou bien la crise œstrogène n'aura lieu que beaucoup plus tard, après la naissance, chez la Poulette.

Nous arrivons ainsi à envisager la signification des substances œstrogènes chez l'embryon mâle.

La propriété que nous avons décelée n'est pas caractéristique des composés de l'œstrone, puisque les hormones mâles, à dose suffisante, peuvent déclancher les signes vaginaux de l'œstrus de la Rate. L'hormone mâle, la plus active sur le vagin de la Rate castrée, est la trans-androsténediol; son activité est le 1/5000^e de celle de l'œstrone (DEANESLY et PARKES). Si, dans nos extraits vitellins, il y avait une hormone bisexuelle de cet ordre, elle devrait atteindre au moins une valeur de $20 \gamma \times 5000 = 100.000 \gamma$ ou 100 mgr. Mais, à cette dose, l'activité sur la crête serait positive. Le Chapon Sebright 802 aurait pris la crête mâle puisqu'il est sensible à 10 γ de testostérone; en effet, un mgr. d'androsténediol équivaut à 2 unités Chapon ou 20 γ de testostérone. Ainsi, la dose journalière injectée correspondrait à $27 \times 5.000 = 135.000 \gamma$ ou 135 mgr., équivalant à l'action de $135 \times 20 = 2.700 \gamma$ de testostérone. Comme on le voit, à cette dose massive, la crête de notre Sebright aurait subi une croissance rapide et importante, ce qui ne s'est nullement produit. Par conséquent, la substance œstrogène de

l'embryon mâle est très vraisemblablement un stérile du groupe œstrone.

SIVADJIAN (1938) rapporte, d'après SERONO et MONTEZEMOLO (travail italien que nous n'avons pu nous procurer), que les substances œstrogènes se forment dans l'œuf pendant l'incubation ; nous avons vu ce qu'il en est .

GREENWOOD et BLYTH (1929) ont émis l'hypothèse que le plumage infantile du Poulet serait conditionné par des substances œstrogènes contenues dans le vitellus non résorbé à la naissance. Il n'apparaît pas, d'après nos expériences, que cette supposition puisse être retenue, puisque les substances en question ont disparu à peu près totalement à l'éclosion. D'autre part, CARIDROIT et RÉGNIER ont montré que le plumage infantile du mâle (Coq et Canard) ne dépendait pas des gonades, puisque la castration précoce du Poussin ne le modifie pas. Le problème du plumage infantile n'est donc pas encore résolu.

On peut plus vraisemblablement penser que les substances œstrogènes représentent les *organiseurs embryonnaires*. WADDINGTON et NEEDHAM (1935) montrent, en effet, que l'extrait éthéré glycogénique embryonnaire a le pouvoir d'organisateur. Ces organisateurs appartiennent, selon ces auteurs, au groupe des stériles et ont des propriétés très voisines des hormones ; il ne serait donc pas étonnant que nous aurions mis ainsi en évidence, par des propriétés œstrogènes, la présence de ces organisateurs. Nous aurions ainsi montré que les organisateurs de l'embryon mâle sont différents des organisateurs de l'embryon femelle.

WOLFF (1935) d'une part, et DANTCHAKOFF (1935) d'autre part, ont montré qu'on pouvait induire un sexe différent du sexe génétique par des injections d'hormones sexuelles chimiques (androstérone, testostérone, folliculine) dans l'œuf ou l'embryon.

Nos expériences montrent qu'il peut y avoir un mécanisme humoral de différenciation qui agit à un certain stade. Les substances en jeu n'auraient pas les propriétés des hormones sexuelles, mais seraient les organisateurs dont le pouvoir

œstrogène ne serait peut-être qu'accessoire, mais qui nous permet de faire une différence entre l'embryon mâle et l'embryon femelle. L'organisateur serait une substance assez éloignée des hormones sexuelles que nous connaissons actuellement.

CONCLUSIONS GENERALES

La présence de substances œstrogènes dans l'œuf a été signalée par plusieurs auteurs, mais leur étude ne semble pas avoir fait l'objet d'expériences systématiques.

Les expériences de V. DANTCHAKOFF et de E. WOLFF, qui ont montré que l'inversion du sexe pouvait s'obtenir chez l'embryon par injections d'hormones pures, devaient trouver leur complément par une étude des hormones qu'un embryon normal pouvait contenir.

Notre travail a donc d'abord consisté à mettre au point une technique d'extraction des hormones sexuelles, puis à étudier la teneur des œufs et des embryons en ces substances.

Avec les œufs, nos résultats montrèrent l'importance de la fécondation. Les œufs non fécondés ne contiennent pas de substances œstrogènes en quantité décelable par le test vaginal de la Rate castrée. Les œufs fécondés de Poule contiennent par contre l'équivalent de 30 à 35 γ d'œstrone.

En étudiant les œufs d'autres oiseaux (Canes, Tourterelles, Pigeons) nous avons pu confirmer notre conclusion sur l'importance de la fécondation. Nous avons observé en outre que la teneur en substances œstrogènes variait avec l'espèce d'oiseau, et qu'elle était d'autant plus faible que l'œuf était plus petit. Le rapport :

Teneur moyenne en substances œstrogènes

Poids moyen du vitellus correspondant

donne toujours le même nombre. Il semble donc que l'on puisse penser à une modification des stérines du vitellus sous l'influence du début de développement de la cellule-œuf, avant la ponte.

L'augmentation artificielle de la teneur en hormones œstrogènes de Poules non fécondées n'apparaît pas dans l'œuf qui reste aussi inactif qu'avant les injections faites à la pondreuse. Cette expérience confirme donc l'origine endogène des substances hormonales que nous décelons.

Chez l'*embryon*, nous avons pu mettre en évidence une différence nette au cours de l'incubation entre le sexe mâle et le sexe femelle.

Dès les premiers jours de l'incubation, tous les œufs s'appauvrissent en substances œstrogènes. Puis, phénomène d'apparence paradoxale, la teneur en substances œstrogènes augmente chez l'embryon mâle du 8^e au 16^e jour et atteint l'équivalent de 24 γ d'œstrone; mais au 20^e jour, c'est-à-dire au moment de la sortie du poussin, le taux est de nouveau abaissé à l'équivalent de 4 γ .

L'embryon femelle ne nous a toujours donné que des chiffres voisins de cette valeur minima.

Le *vitellus*, aussi bien chez le mâle que chez la femelle, reste toujours pauvre.

L'interprétation qui nous paraît la plus vraisemblable est l'attribution à des *organismes embryonnaires* de cette propriété œstrogène. L'organisateur mâle se différencierait ainsi de l'organisateur femelle; la propriété féminisante ne gênerait d'ailleurs en rien l'évolution des testicules, car elle est de trop faible intensité pour avoir une action inhibitrice quelconque.

Nous pensons que ces substances n'auraient pas la même origine que celles de l'œuf fécondé; alors que dans ce dernier on peut penser à une modification de stérols, dans l'embryon les substances œstrogènes sont synthétisées. Ainsi s'expliquerait l'abaissement si net du début de l'incubation chez l'embryon mâle.

Nous n'avons pas pu, par des méthodes chimiques, rechercher la nature de ces substances. Nous avons soumis plusieurs tests à leur influence.

Outre le test vaginal, nous avons étudié l'action sur l'utérus de la Rate castrée. Nous avons aussi pratiqué des injections à des Chapons de race Leghorn doré et de race Sebright. L'activité des extraits vitellins et embryonnaires a toujours été dans le même sens, pour ces tests, que l'œstrone. Nous avons pu même noter que nos extraits agissaient mieux sur l'utérus de la Rate et le plumage des Chapons que l'équivalent en œstrone déterminé par le test du vagin. Nous ne savons pas si cette différence tient à un composé plus actif ou à la présence de substances favorisantes.

Nous n'avons pas manqué naturellement de faire la recherche des substances androgènes. Nous avons à cet effet modifié notre technique. Sans hydrolyse ou avec hydrolyse, nos extraits d'œuf ou d'embryons mâle ou femelle n'ont jamais fait développer la crête du Chapon ou l'épithélium de la vésicule séminale de Rat impubère.

Vu :

LE DOYEN :

A. DAMIENS

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

A. GORIS.

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSEN (O.). — Untersuchungen über das Lysozym aus dem *Micrococcus lysodeicticus*. *Zeits. für Immunitätsforschung*, 1931.
2. ARTAULT (St.). — Recherches sur les microorganismes de l'œuf. *Thèse Médecine*, Paris, 1893.
3. BAILLY (O.). — Recherches sur la constitution des éthers phosphoriques de la glycérine. *Thèse doct. sciences*, Paris, 1916.
4. BERNARD (Cl.). — Leçons sur les phénomènes de la vie, communs aux animaux et aux végétaux. *T. I.*, p. 105.
5. BETHKE (R.-M.), KENNARD (D. C.) and SASSAMAN (H. L.). — The fat soluble vitamin content of Hen's egg yolk as affected by the ration and management of the layers. *Journ. of biol. chem.*, 1937, 72, 695-706.
6. BIERRY (H.). — Sur les glucides et les corps glucidoformateurs de l'œuf de poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, T. 101, 579.
7. BIERRY (H.) et GOUZON (B.). — Sur les substances fluorescentes de la coquille d'œuf de poule. *C. R. Acad. Sc.*, 1930, T. 194, p. 653.
8. BIERRY (H.), HAZARD et RANC (A.). — Sur les hydrates de cerbone de l'œuf de poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, T. 83, p. 93.
9. BINET (L.). — L'œuf d'oiseau *Traité de physiologie normale et pathologique*, 1934, T. 11, p. 453-460.
10. BINET (L.) et JERAMEC (C.). — Influence de l'ovalbumine sur l'évolution de quelques bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, T. 113, p. 1103.
11. BORDET (M.). — Contribution à l'étude du lysozyme. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, T. 99, p. 1251.
12. BUNGE (G.). — Ueber die Assimilation des Eisens. *Zeitsch. f. Physiol. Chem.*, 1885, Bd. 9, 49.
13. CARIDROIT (F.). — De l'action du benzoate de folliculine sur le plumage du coq domestique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 118, p. 523.
14. CARIDROIT (F.). — Croisement entre les races Sebright doré et Sebright argenté. Hérité liée au sexe et hérité contrôlée par le sexe. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, T. 124, p. 507.

15. CARIDROIT (F.). — Contrôle des caractères pigmentaires raciaux par une hormone masculinisante (Propionate de testostérone). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, T. 126, p. 732-734.
16. CARIDROIT (F.) et GLEY (P.). — Le dosage des hormones sexuelles. *Revue Scientif.*, 15 juin 1938, p. 237-248.
17. CARIDROIT (F.) et RÉGNIER (V.). — Génétique et hormones sexuelles. Wissenber. des VI^e Weltgeflügelkong. Berlin-Leipzig, 1936, Bd. 11, Sekt. III, p. 12.
18. CHAMPY (Ch.). — Action inhibitrice de la testostérone sur le plumage d'un coq Sebright castré. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, T. 125, p. 329.
19. COURRIER (R.) et POTVIN (P.). — Réaction utérine chez la lapine castrée à l'injection de liquide folliculaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, T. 94, p. 878.
20. COTER (P.). — La coquille de l'œuf de Poule. *Thèse médecine*, Paris, 1932, n° 302.
21. CRUISKSHANK (E.M.) and MOORE (T.). — The effect of the administration of large amounts of vitamin A on the vitamin A content of the hen's egg. *Biochem. J.*, 1937, T. 31, p. 179-187.
22. DANTCHAKOFF (V.). — Sur les effets morphogénétiques de la folliculine dans l'ébauche testiculaire du Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 119, p. 1117.
23. DANTCHAKOFF (V.). — Sur l'inefficacité de l'hormone mâle à produire une inversion sexuelle sur les ébauches gonadiques femelles du Poulet et sur ses causes. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 119, p. 1120.
24. DANTCHAKOFF (V.). — Sur les effets morphogénétiques de la folliculine dans l'ébauche testiculaire stérile (gauche) d'un embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 119, p. 1466.
25. DANTCHAKOFF (V.). — Sur l'inversion sexuelle expérimentale de l'ébauche ovarique chez l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 120, p. 597.
26. DANTCHAKOFF (V.). — Sur le mécanisme d'action de la folliculine dans un embryon mâle. *C. R. Soc. Biol.*, T. 120, p. 980.
27. DANTCHAKOFF (V.). — Sur l'inversion sexuelle expérimentale de l'ébauche testiculaire chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, T. 200, p. 1983.
28. DANTCHAKOFF (V.). — Sur les facteurs déterminant les caractères sexuels secondaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1936, T. 202, p. 1820.
29. DASTRE (A.). — Des corps biréfringents de l'œuf des ovipares. *Thèse Doct. Sciences*, Paris, 1876.

30. DAVID (K.), FREUD (J.), and JONGH (S. E. de). — Condition of hypertrophy of seminal vesicles in rats. II- the effects of derivations of œstrone (menformon). *Bioch. J.*, 1934, T. 28, p. 1360-1367.
31. DEANESLY (R.). — The androgenic activity of ovarian grafts in castrated male rats. *Proc. Roy. Soc. London*, 1938, 126 B., p. 122-135.
32. DELEZENNE (C.) et FOURNEAU (E.). — Sur la part que prend la chaux de la coquille de l'œuf de Poule à la formation du squelette du poussin pendant l'incubation. *Annales Inst. Past.*, 1918, T. 32, n° 9, p. 413.
33. DELEZENNE (C.) et POZERSKI (E.). — Action empêchante de l'ovalbumine crue sur la digestion trypsique de l'ovalbumine coagulée. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, T. LV, p. 935. *Id.* 1905, T. 58, p. 560.
34. DERRIEN (E.). — Note préliminaire sur quelques faits nouveaux pour l'histoire naturelle des porphyrines animales. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, T. 91, p. 634.
35. DHÉRÉ (Ch.). — Spectre de fluorescence de la coquille de l'œuf de Poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, T. 112, p. 1595.
36. EBHARDT (K.). — Untersuchungen über den Einfluss des ovarialhormons auf den Genitalapparat und die Mamma. *Monat. Geburtsh.*, 1928, Bd. 79, p. 233-236.
37. ELVEHJEM (C. A.), KEMMERER (A.R.) and HART (E.B.). — The effect of the diet of the hen on the iron and copper content of the egg. *Journ. of Biol. Chem.*, 1929, T. 85, p. 89.
38. FELLNER (O., O.). — Ueber das Vorkomen des femininen Sexualhormons in den Vogeleiern und den Eierstöcken der Fische. *Klin. Woch.*, 1925, Bd. 4, 1651-1652.
39. FLEMING (Al.) and ALLISON (V.D.). — On the antibacterial power of egg-white. *The Lancet* vol. 206, 1924, p. 1303. *Proceed. Royal Society*, 1922, T. 94, p. 142.
40. FISCHER (A.). — La spécificité des hormones sexuelles. *Rev. Française d'Endocrinologie*, 1938, T. 16, p. 1 à 28.
41. FURREG (E.). — Ueber die Kuikula des Vogeleies und ein Nachweis ihres Bildungsortes. *Biol. Zentralbl.*, 1931, T. 51, p. 162-173.
42. GAUJOUX (E.) et KRIJANOWSKY (A.). — Teneur comparée en cholestérol du jaune d'œuf des oiseaux de basse-cour. *C. R. Biol.*, 1932, T. 110, p. 1083.
43. GAYON (U.). — Sur les altérations spontanées des œufs. *C. R. Acad. Sc.*, 1873.
44. GLIMM (E.) und WADEHN (F.). — Ueber Sexualhormon insbesondere das Feminin. *Bioch. Z.*, 1930, Bd. 219, 155-160.

45. GREENWOOD (A.-W.) and BLYTH (J.S.S.). — An experimental Analysis on the plumage of the Brown Leghorn fowl. *Proc. Royal Soc. Edinburg.* Fev. 1929, vol. 49, Part. IV, p. 313-354.
46. GRIGAUT (A.). — Le cycle de la cholestérine. *Thèse médecine*, Paris, 1913, p. 74.
47. HARN (L.) and HEVESY (G.). — Origin of yolk lecithin. *Nature* : 1937, T. 140, p. 1059.
48. HEIM DE BALSAC (H.). — Composition minérale de la coquille des œufs d'oiseaux. Fonction nutritive de la coquille. *Alauda* 3, 1931, p. 173-184.
49. HERLITZKA (A.). — Sur l'ontogénèse des ferments. *Arch. ital. Biol.*, 1907, T. 48, p. 119.
50. HUGUES (J.S.), TITUS (R.W.) and MOORE (J.M.). — Ultra-violet light and antirachitic vitamin in the hen's eggs. *Sciences*, nov. 1925, p. 492.
51. HUGOUNEQ (L.) et MOREL (A.). — Recherches sur l'hématogène. *C. R. Acad. Sc.*, 1905, T. 140, p. 1065.
52. HUGOUNEQ (L.) et MOREL (A.). — Recherches sur l'hématogène et l'origine de l'hémoglobine. *Journ. Phys. et Pathol. gén.*, 1906, T. 7, p. 391.
53. KAY (H.D.) et MARSHALL (P.G.). — The second protein (Livetin) of Egg-Yolk. *Biochem. Journ.*, 1928, T. 22, p. 1264.
54. KORENCHESKY (V.) and DENNISON (M.). — The effects of œstrone on normal and castrated male Rats. *Bioch. J.*, 1934, T. 28, p. 1474-1485.
55. KORENCHESKY (V.) and DENNISON (M.). — Histological changes in the organs of rat injected with œstrone and testicular hormone. *J. Path. Bact.*, 1935, T. 41, p. 323-338.
56. KORENCHESKY (V.) DENNISON (M.) and SIMPSON (S. L.). — The prolonged treatment of male and female rats with androsterone and its derivatives alone or together with œstrone. *Bioch. J.*, 1935, T. 29, p. 2534-2552.
57. KOZELKA (A. W.) and GALLAGHER (T. F.). — Effect of male hormone extract, theelin and theelol on the chick embryo. *Proc. Soc. Biol.*, 1934, T. 31, p. 1143-1144.
58. KUO (Zing Yang). — Ontogeny of embryonic behavior in Aves. I- The chronology and general nature of the behavior of the chick embryo. *Journ. exp. zool.*, 1932, T. 61, p. 395-430.
59. LANGSTON (W.C.) and ROBINSON (B.L.). — Castration atrophy. A chronological study of uterine changes, following bilateral ovariectomy in the albino rat. *Endocr.*, 1935, T. 119, p. 51-62.
60. LATASTE (F.). — La chambre à air de l'œuf de poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 92, p. 134.
61. LIENHART (R.). — Observations sur le nombre et le poids des œufs de Poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, T. 88, p. 1103.

62. LUCAM. — Perméabilité des enveloppes des œufs. *Thèse doct. vétérinaire*, Paris, 1930.
63. MARSHALL (F.H.A.). — The physiology of Reproduction, 1922, p. 277-288.
64. MASSERON. — Œuf du marché. *Thèse vétérinaire*, Paris, 1930.
65. MAUGHAN (G. H. and T.). — The Vitamin D potency of egg yolk from irradiated hens. *Science*, 198, fév. 1933.
66. MIHAILESCU (N.). — Observations sur la chambre à air chez les œufs de poule. *Atti, V^e Congr. Intern. Pollic., 1^{re} section (génétique)*, n° 15, Rome, 1933.
67. MORELL (J.-A.), Mc HERNY (E. W.) and POWERS (H. H.). — Distribution and preparation of ovarian follicular hormones. *Endocr.*, 1930, T. 14, p. 25-27.
68. MORGAN (T. H.). — The genetic and operative evidence relating to secondary sexual characters. *Carnegie Inst. Pub.*, 1919, p. 285.
69. MORGAN (T. H.). — Embryologie et Génétique, trad. J. Rostand., Gallimard, édit., Paris, 1936.
70. NEEDHAM (J.). — L'excrétion de l'azote par l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, T. 95, p. 1399.
71. ORRU (A.). — Sulla velocità di accrescimento dell'uovo di Gallina. *Atti, Accad. Lincei*, 1936, T. 23, p. 954-912.
72. OSBORNE (W. A.). — A note of the permeability of egg shell. *Aust Journ. exp. Biol. and Med. Sc.*, 1931, T. 8, p. 239-240.
73. PÉZARD (A.). — Sur la détermination des caractères sexuels secondaires chez les Gallinacés. *C. R. Acad. Sc.*, 1911, T. 133, p. 1027.
74. PÉZARD (A.). — Le conditionnement physiologique des caractères sexuels secondaires chez les Oiseaux. *Bul. Sc. France-Belgique*, 1918, T. 12, p. 1.
75. PÉZARD (A.) et CARIDROIT (F.). — L'hérédité sex-linked chez les Gallinacés. Interprétation fondée sur l'existence de la forme neutre et sur les propriétés de l'hormone ovarienne. *C. R. Acad. Sc.*, 1922, T. 175, p. 910.
76. PÉZARD (A.) et CARIDROIT (F.). — Remarques au sujet de l'hérédité sex-linked chez les Gallinacés. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, T. 91, p. 935.
77. PÉZARD (A.) et CARIDROIT (F.). — Caractères sexuels secondaires. *Traité de Physiol.* Royer et Binet, Masson édit., 2^e édit. p. 163.
78. PÉZARD (A.), SAND (K.) et CARIDROIT (F.). — Le gynandromorphisme biparti expérimental. Récurrences raciales dictées par la mue automnale et caractères transitoires de certaines modifications pigmentaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1924, T. 177, p. 1087.

79. PÉZARD (A.), SAND (K.) et CARIDROIT (F.). — Une notion nouvelle : l'existence d'un seuil différentiel racial dans certains complexes hybrides des Gallinacés. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 92, p. 495.
80. PÉZARD (A.), SAND (K.) et CARIDROIT (F.). — Inversion nouvelle du plumage observée chez nos sujets lors de la récente mue et notion de seuil hormonique. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 93, p. 1094.
81. RÉGNIER (V.). — Etude d'un nouveau cas de transmission héréditaire du caractère de sensibilité pigmentaire du plumage à l'hormone ovarienne, dans un croisement de Poules domestiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 118, p. 848.
82. RÉGNIER (V.). — Hormone ovarienne et caractères raciaux du plumage chez le Coq et la Poule domestiques. *Bul. Biol. France et Belgique*, 1937, Suppl. XXII.
83. RÉGNIER (V.) et CARIDROIT (F.). — Action du benzoate d'œstradiol sur la crête des Poules. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, T. 28, p. 404.
84. RIBOULLEAU (J.). — Teneur en substances œstrogènes de l'œuf vierge et de l'œuf fécondé des Oiseaux. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, T. 129, p. 914.
85. RIBOULLEAU (J.). — Variation des substances œstrogènes de l'œuf de Poule au cours de l'incubation. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, T. 129, p. 1045.
86. ROCHAIX (A.). — Contamination bactérienne des œufs. *Journal Médecine*, Lyon, 5 juin 1934.
87. ROCHAIX (A.) et COUTURE (E.). — Sur le pouvoir microbicide du blanc d'œuf. *Société de Pathol. comp.*, 10 avril, 1934.
88. ROFFO (A. H.) et AZARETTI (I.). — La coleslerina y su relacion con el crecimiento de los tejidos. Determinaciones en embriones de pollo. *Bol. Inst. Med. Exp.*, 1926, T. 11, p. 629-633 (d'après *Année Biologique*, 1926-1927, 1^{re} part., p. 588).
89. ROGER (H.). — Amylase du jaune d'œuf. Action zymosthénique de l'œuf, in *Digestion et nutrition*. Paris, 1910.
90. ROMANKEVITCH (N.). — Die biomorphologischen Besonderheiten der Struktur der Membrana Testae des Hühnereies. *Ztschr. f. Zellf u. mikrosk. Anat.*, 1932, Bd. 16, 208-216.
91. ROMER, FAUGAUF, LOSSL und KAMSEDER. — Zweiter Bericht der uhr und Versuchsanstalt für Geflügelzucht Halle Cröllwitz, 1923-1924 (*Geflügelzeitung*, Bd. 20, 1924, p. 466).
92. RUBINSTEIN (M.). — Evolution du pH, des courbes de neutralisation et de coefficient tampon des constituants de l'œuf de Poule pendant l'incubation. *Arch. phys. biol.*, 1933, T. 11, p. 40-71.
93. RUBINSTEIN (M.). — L'évolution du pH des constituants de l'œuf de Poule pendant l'incubation. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, T. 111, p. 60-63.

94. SHIKINAMI (Y.). — Ueber die Hypoglykämie erzeugender Stoffe aus verschiedenentierischen Substanzen, besonders aus Eigelb des Hühnereies. *Tohoku Journ. exp. Med.*, 1928, 10, 1-25.
95. SIVADJIAN (J.). — Chimie des vitamines et des hormones, éd. 1938. Gauthier-Villars, édit.
96. SKARZYNSKI (B.). — Untersuchungen über den Sterinstoffwechsel während der Entwicklung des Hühnereies. *Bul. intern. Acad. Sc. Cracovie*, 1936, III, B. 2, 437-452.
97. SZUMAN (J.-G.). — La structure de la membrane testacée de l'œuf. *C. R. Acad. Sciences*, 1925, T. 181, p. 257.
98. TAPERNOUX (A.). — Différenciation entre les œufs frais et les œufs conservés par le procédé à la chaux au moyen de la lumière de Wood. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, T. 105, p. 405.
99. TERROINE (E.-F.) et BELIN (P.). — Influence de l'alimentation sur la composition quantitative de l'œuf de Poule. *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 2^e p., p. 1074-1080.
100. THIEULIN. — Altération des œufs. *Recueil de médecine vétérinaire*, oct. 1933.
101. VERSEL (L.). — L'œuf de Poule au point de vue de l'alimentation. *Thèse doct. pharmacie*, Lyon, 1935.
102. VITOUX et FLANDEAU. — Age de l'œuf. *Annales fals. et fraudes*, 1925, p. 471.
103. WADDINGTON (C. H.), NEEDHAM (J.), NOWINSKI (W. W.), NEEDHAM (D. M.) and LEMBERG (R.). — Active principle of the Amphibian Organisation Centre. *Nature*, 1934, T. 134, p. 103.
104. WADDINGTON (C. H.), NEEDHAM (J.) and others. — Studies on the Nature of the Amphibian Organization Centre. I) Chemical Properties of the Evocator. II) Induction by synthetic polycyclic hydrocarbons. *Proceed. Royal Soc. London*, 1935, T. 117, B., p. 289-317.
105. WADDINGTON (C. H.), NEEDHAM (J.) and BRACHET (J.). — Studies on the Nature of the Amphibian Organization Centre. III) The Derivation of Evocator. IV) Further Experiments on the Chemistry of the Evocator. *Proceed. Royal Soc., London*, 1936, B., T. 120, p. 173-207.
106. WOHLGEMUTH. — Ueber das Vorkommen der Fermente im Hühnerei. *Festschrift f. Salkowsky*, Berlin, 1904.
107. WOHLGEMUTH. — Ueber den Sitz der Fermente in Hühnerei. *Zeitschrift f. Phys. Chemie*. 1905, Bd. 44, S. 540.
108. WOLFF (E.). — Sur l'évolution des intersexués mâles, obtenus par injection de folliculine aux embryons de Poulet. Les transformations histologiques des glandes génitales après l'éclosion. *C. R. Soc. Biol.*, 1935 T. 120, p. 903.

109. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Sur la transformation des Poulets mâles en intersexués par l'injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *A. Anat. Hist.*, 1935, T. 20, p. 219-278.
110. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Sur la production expérimentale d'intersexués par l'injection de folliculine à l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, T. 200, p. 2118.
111. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Caractères des intersexués obtenus expérimentalement chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, T. 200, p. 2221.
112. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Sur les doses de folliculine nécessaires pour réaliser des intersexués et sur le stade limite de l'intervention. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 120, p. 114.
113. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Sur la structure des glandes génitales de différents types d'intersexués obtenus par injection de folliculine aux embryons de Poulets mâles. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 120, p. 116.
114. WOLFF (E.) et GINGLINGER (A.). — Sur l'évolution des intersexués mâles, obtenus par injection de folliculine aux embryons de de Poulet. Les transformations des organes génitaux après l'éclosion. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. 120, p. 901.
115. WURTZ. — De l'action bactéricide du blanc d'œuf. *C. R. Soc. Biol.*, 1890, T. 92, p. 20.
116. ZORN (C. M.) and DALTON (A. J.). — Chemical Study of Blood of developping Chick. *Amer. J. Physiol.*, 1937, T. 119, p. 627-634.

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction</i>	1
-------------------------------	---

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER — <i>L'œuf de poule</i>	5
--	---

CHAPITRE II. — <i>Méthodes d'extraction des substances hormonales</i>	13
---	----

CHAPITRE III. — <i>Méthodes biologiques de dosage</i>	17
<i>a) Test du vagin de la rate castrée</i>	17
<i>b) Test de l'utérus de la rate castrée</i>	21
<i>c) Test du plumage du chapon</i>	22
<i>d) Test de la crête du chapon</i>	25
<i>e) Test des vésicules séminales du rat castré</i>	25

CHAPITRE IV. — <i>Résultats expérimentaux obtenus avec l'œuf</i>	29
--	----

CHAPITRE V. — <i>Discussion des résultats</i>	49
---	----

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Les substances œstrogènes de l'œuf de poule au cours de l'incubation et dans l'embryon</i> . .	55
---	----

CHAPITRE II. — <i>Discussion des résultats</i>	63
--	----

CONCLUSIONS GENERALES	71
---------------------------------	----

<i>Bibliographie</i>	75
--------------------------------	----



IMPRIMERIE SPECIALE
DE
MM. VIGOT Frères



